

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SONN, Helmut
Riemergasse 14
A-1010 Wien
AUTRICHE

Date of mailing (day/month/year) 22 July 1999 (22.07.99)	
Applicant's or agent's file reference R 33814	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/AT98/00043	International filing date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.98)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☒ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address

FISCHER, Bernhard
Wilhelminenstrasse 95/C/17
A-1160 Wien
Austria

State of Nationality

DE

State of Residence

AT

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person
 ☐ the name
 ☒ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address

FISCHER, Bernhard
Wilhelminenstrasse 95/C/17
A-1160 Wien
Austria

State of Nationality

DE

State of Residence

AT

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Jocelyne Rey-Millet Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

09 October 1998 (09.10.98)

International application No.

PCT/AT98/00043

Applicant's or agent's file reference

R 33814

International filing date (day/month/year)

27 February 1998 (27.02.98)

Priority date (day/month/year)

27 February 1997 (27.02.97)

Applicant

MITTERER, Artur et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

19 September 1998 (19.09.98)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Jocelyne Rey-Millet

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SONN, Helmut
Riemergasse 14
A-1010 Wien
AUTRICHE

Date of mailing (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)	
Applicant's or agent's file reference R 33814	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/AT98/00043	International filing date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.98)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input checked="" type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address FISCHER, Bernhard Jägerhausgasse 14/11 A-1120 Wien Austria	State of Nationality DE	State of Residence AT
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address FISCHER, Bernhard Wilheminenstrasse 95/C/17 A-1160 Wien Austria	State of Nationality DE	State of Residence AT
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary: 		
4. A copy of this notification has been sent to: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority </div> <div> <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> other: </div> </div>		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Yolaine CUSSAC Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SONN, Helmut
Riemergasse 14
A-1010 Wien
AUTRICHE

Date of mailing (day/month/year) 26 July 1999 (26.07.99)	
Applicant's or agent's file reference R 33814	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/AT98/00043	International filing date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.98)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT Industriestrasse 67 A-1221 Wien Austria	State of Nationality AT	State of Residence AT
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input checked="" type="checkbox"/> the name <input type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT Industriestrasse 67 A-1221 Wien Austria	State of Nationality AT	State of Residence AT
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority </div> <div> <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> other: </div> </div>		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Jocelyne Rey-Millet Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

REC'D 03 JUL 1998
WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts R 33814	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/AT 98/00043	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/02/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 27/02/1997
Anmelder IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,

☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,

☐ dem jedoch keine Erklärung beigefügt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.

☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr.

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K14/755 A61K38/37

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 600 480 A (SCLAVO SPA ; AIMA DERIVATI SPA (IT)) 8. Juni 1994 siehe Ansprüche; Beispiel ---	1,5,6, 8-17
A	WO 93 15199 A (RHONE-POULENC RORER SA) 5. August 1993 siehe Ansprüche; Beispiel 7 ---	1,9
A	WO 91 13093 A (BIO TECHNOLOGY GENERAL CORP) 5. September 1991 siehe Ansprüche; Beispiel 4 ---	1,9
X	EP 0 295 645 A (ZYMOGENETICS INC) 21. Dezember 1988 siehe Seite 5, Zeile 49 - Seite 6, Zeile 3; Ansprüche 10-13; Beispiel 5 ---	1,9,10, 13-16
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Juni 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

03/07/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 97 34930 A (IMMUNO AG ; FISCHER BERNHARD (AT); MITTERER ARTUR (AT); DORNER FRIE) 25.September 1997 siehe Ansprüche; Beispiele ----	1,9-16
P,X	WO 97 39033 A (IMMUNO AG ; SCHOENHOFER WOLFGANG (AT); EIBL JOHANN (AT); WEBER ALFR) 23.Oktober 1997 siehe Ansprüche; Beispiele -----	1,9-16



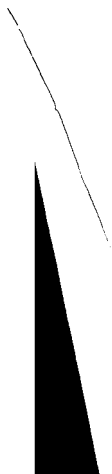
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 98/00043

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0600480	A	08-06-1994	IT 1256622 B	12-12-1995
WO 9315199	A	05-08-1993	FR 2686899 A	06-08-1993
			EP 0624195 A	17-11-1994
			FI 943563 A	29-07-1994
			JP 7503368 T	13-04-1995
WO 9113093	A	05-09-1991	AU 645077 B	06-01-1994
			AU 7496491 A	18-09-1991
			CA 2077446 A	03-09-1991
			EP 0517826 A	16-12-1992
			FI 923935 A	02-09-1992
EP 0295645	A	21-12-1988	US 5200510 A	06-04-1993
			DK 331488 A	17-12-1988
			JP 1100196 A	18-04-1989
WO 9734930	A	25-09-1997	AT 403764 B	25-05-1998
			AT 49496 A	15-10-1997
WO 9739033	A	23-10-1997	AT 403765 B	25-05-1998
			AT 66796 A	15-10-1997



Translation
09/367409

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference R 33814	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/AT98/00043	International filing date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.1998)	Priority date (day/month/year) 27 February 1997 (27.02.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/755, A61K 38/37		
Applicant BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.	
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.	
<input checked="" type="checkbox"/>	This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).
These annexes consist of a total of <u>3</u> sheets.	
3. This report contains indications relating to the following items:	
I <input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the report
II <input type="checkbox"/>	Priority
III <input type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input checked="" type="checkbox"/>	Certain documents cited
VII <input type="checkbox"/>	Certain defects in the international application
VIII <input checked="" type="checkbox"/>	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 19 September 1998 (19.09.1998)	Date of completion of this report 28 May 1999 (28.05.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/AT98/00043

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-18, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages _____, filed with the letter of _____,
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-16, filed with the letter of 17 September 1998 (17.09.1998),
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/2,2/2, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:



V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The object of the present invention is (see in particular the description, page 3 paragraphs 2-5) to make available a method and the resulting factor VIII/vWF complex with an improved specific activity and stability. This object was achieved by means of a method characterized by a cation-exchanger and gradual elution. In order to improve the specific activity, vWF multimers of low molecular weight should be separated when obtaining the complex; the complexes resulting from this process are characterized by their structure, which is formed with vWF multimers of predominantly high molecular weight, and the effect of increased specific vWF activity, which results therefrom. Furthermore, contaminating substances, which are normally contained in plasma fractions, are removed during this process.

With respect to the prior art, the subject matter of Claims 1-16 is recognized as being novel and involving an inventive step (PCT Article 33(2) and (3), PCT Rule 64.1 and 65). The present method and product, characterized by the cation-exchanger, gradual elution, and vWF multimers of high molecular weight, are not anticipated by the prior art and are not obvious to a person skilled in the art.

This report is based on the assumption that all claims enjoy the priority of the filing date of the priority document: in this case, WO 97/34930 and WO 97/39033, referred to in the international search report as P,X documents, do not belong to the prior art (also see Section VI).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/AT 98/00043

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: VI .

WO 97/34930 and WO 97/39033 are referred to according to
PCT Rule 70.10.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The phrases used in the independent claims, "especially" and "essentially free of" leave the reader uncertain as to meaning of the indicated technical features concerned. Therefore, these claims do not set out with sufficient clarity the subject matter for which protection is sought as well as the delimitation of the invention over prior art (PCT Article 6 and PCT Rule 6.3).

The document cited in the search report, EP-A-0 295 645, which provides the relevant prior art, has not been indicated in the description (PCT Rule 5.1(a)(ii)).

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 04 JUN 1999

WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts R 33814	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/AT98/00043	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/02/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 27/02/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K14/755		
Anmelder IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 19/09/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 28.05.99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter Halle, F Tel. Nr. (+49-89) 2399 8537 

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-18 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-16 eingegangen am 19/09/1998 mit Schreiben vom 17/09/1998

Zeichnungen, Blätter:

1/2,2/2 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüch	1-16
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde (siehe insbesondere Beschreibung, Seite 3, Absätze 2-5) ein Verfahren und den daraus resultierenden Faktor VIII/vWF-Komplex mit einer verbesserten spezifischen Aktivität und Stabilität zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgabe wurde mittels einem Verfahren, gekennzeichnet durch einen Kationenaustauscher und eine stufenweise Elution, gelöst. Um die verbesserte spezifische Aktivität zu erlangen sollten bei der Gewinnung des Komplexes niedermolekulare vWF-Multimere abgetrennt werden; die dadurch erhaltenen Komplexe sind gekennzeichnet durch ihre mit überwiegend hochmolekularen vWF-Multimeren zusammengesetzte Struktur und den davon ausgehenden Effekt der erhöhten spezifischen vWF-Aktivität. Außerdem werden durch dieses Verfahren kontaminierende Substanzen entfernt die üblicherweise in Plasmafraktionen enthalten sind.

Im Hinblick auf den Stand der Technik wird dem Gegenstand der Ansprüche 1-16 Neuheit und erfinderische Tätigkeit anerkannt (Artikel 33(2)(3), Regel 64.1, 65 PCT). Das vorliegende Verfahren und Produkt gekennzeichnet durch den Kationenaustauscher, die stufenweise Elution und die hochmolekularen vWF-Multimeren sind nicht durch den Stand der Technik vorweggenommen und auch nicht für die Fachperson als naheliegend anzusehen.

Diesem Bericht liegt die Annahme zugrunde, daß alle Ansprüche die Priorität des Anmeldetags des Prioritätsdokuments genießen: in diesem Fall gehören WO 97/34930 und WO 97/39033, gekennzeichnet im internationalen Recherchenbericht als P,X-Dokumente, nicht zum Stand der Technik (siehe auch Punkt VI).

Zu Punkt VI

Auf WO 97/34930 und WO 97/39033 wird nach Regel 70.10 PCT hingewiesen.

Zu Punkt VIII

Die in den unabhängigen Ansprüchen benutzten Ausdrücke "insbesondere" und

"im wesentlichen frei von" lassen den Leser über die Bedeutung der betreffenden angeführten technischen Merkmale im Ungewissen. Der Gegenstand für den Schutz begehrt wird sowie die Abgrenzung der Erfindung gegenüber dem Stand der Technik scheinen daher nicht klar genug aus diesen Ansprüchen hervor zu gehen (Artikel 6 und Regel 6.3 PCT).

Das im Recherchenbericht genannte Dokument EP-A-0 295 645, aus dem sich der zugrundeliegende Stand der Technik ergibt, ist nicht in der Beschreibung angegeben (Regel 5.1(a)(ii) PCT).

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Kationenaustauscher gebunden und durch stufenweise Elution Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, gewonnen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex bei einer Salzkonzentration von ≤ 250 mM an einen Kationenaustauscher gebunden wird und Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere, Faktor VIII frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität und Faktor VIII:C bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM eluiert und gewonnen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, durch stufenweise Fraktionierung bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM, vorzugsweise ≥ 350 mM gewonnen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Fraktion gewonnen wird, die insbesondere frei ist von niedermolekularen vWF-Multimeren und vWF-Abbauprodukten, nicht-komplexierten, oder schwach an vWF gebundenem Faktor VIII und kontaminierenden Nukleinsäuren.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution der Polypeptide vom Kationenaustauscher in einem Puffersystem mit einem pH-Wert im Bereich zwischen 4,5 und 8,5, vorzugsweise $\geq 7,1$ und $\leq 8,5$ erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Kationenaustauscher ein Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen konjugierte Träger ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend insbeson-

dere hochmolekulare vWF-Multimere gewonnen wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus Plasma, einer Plasmafraktion, Kryopräzipitat, dem zellfreien Überstand oder Extrakt einer rekombinanten Zellkultur, oder einer angereicherten Proteinfraktion gewonnen wird.

9. Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie.

10. Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß er insbesondere frei ist von niedermolekularen vWF-Multimeren, inaktiven vWF-Abbauprodukten und Faktor VIII frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität und von Faktor VIIIa-Aktivität.

11. Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß er eine spezifische vWF-Aktivität von mindestens 66 U/mg Protein und eine spezifische Faktor VIII-Aktivität von mindestens 500 U/mg Protein aufweist.

12. Faktor VIII:C im wesentlichen frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie und stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 200 mM und ≤ 300 mM.

13. Präparation enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex oder Faktor VIII:C gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie virussicher und frei von infektiösem Material ist.

14. Präparation nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer lagerstabilen Form vorliegt.

15. Präparation nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch ge-

kennzeichnet, daß sie als pharmazeutisches Präparat formuliert ist.

16. Verwendung einer Präparation nach einem der Ansprüche 13 bis 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit Hämophilie A, phänotypischer Hämophilie und vWD.

Claims:

1. A method of recovering factor VIII/vWF-complex, characterized in that factor VIII/vWF-complex from a protein solution is bound to a cation exchanger and is recovered by step-wise elution of factor VIII/vWF-complex, which particularly contains high-molecular vWF-multimers.
2. A method according to claim 1, characterized in that factor VIII/vWF-complex is bound to a cation exchanger at a salt concentration of ≤ 250 mM, and factor VIII/vWF-complex containing low-molecular vWF multimers, factor VIII free from platelet agglutinating vWF activity and factor VIII:C is eluted at a salt concentration of between ≥ 250 mM and ≤ 300 mM and recovered.
3. A method according to claim 1 or 2, characterized in that factor VIII/vWF-complex particularly containing high-molecular vWF multimers is recovered by step-wise fractionation at a salt concentration of ≥ 300 mM, preferably ≥ 350 mM.
4. A method according to claim 3, characterized in that a factor VIII/vWF-complex-containing fraction is recovered which particularly is free from low-molecular

Exp. No. 1

vWF multimers and vWF degradation products, non-complexed factor VIII or factor VIII weakly bound to vWF, and contaminating nucleic acids.

5. A method according to any one of claims 1 to 4, characterized in that the elution of the polypeptides from the cation exchanger is effected in a buffer system having a pH ranging between 4.5 and 8.5, preferably ≥ 7.1 and ≤ 8.5 .

6. A method according to any one of claims 1 to 5, characterized in that the cation exchanger is a sulfopropyl- or carboxymethyl-group-conjugated carrier.

7. A method according to any one of claims 1 to 6, characterized in that a factor VIII/vWF-complex particularly containing high-molecular vWF multimers is recovered.

8. A method according to any one of claims 1 to 7, characterized in that factor VIII/vWF-complex is recovered from plasma, a plasma fraction, cryoprecipitate, the cell-free supernatant or extract of a recombinant cell culture, or from an enriched protein fraction.

9. A factor VIII/vWF-complex particularly containing

high-molecular vWF multimers, obtainable from a factor VIII/vWF-containing solution by cation exchange chromatography.

10. A factor VIII/vWF-complex according to claim 9, characterized in that it is particularly free from low-molecular vWF multimers, inactive vWF-degradation products and factor VIII free from platelet-agglutinating vWF activity and from factor VIIIa activity.

11. A factor VIII/vWF-complex according to claim 10, characterized in that it has a specific vWF activity of at least 66 U/mg protein and a specific factor VIII activity of at least 500 U/mg protein.

12. Factor VIII:C, substantially free from platelet-agglutinating vWF activity, obtainable from a factor VIII/vWF-containing solution by cation exchange chromatography and step-wise elution at a salt concentration of between ≥ 200 mM and ≤ 300 mM.

13. A preparation containing factor VIII/vWF-complex or factor VIII:C according to any one of claims 11 or 12, characterized in that it is virus-safe and free from infectious material.

14. A preparation according to claim 13, characterized in that it is present in storage-stable form.
15. A preparation according to any one of claims 13 or 14, characterized in that it is formulated as a pharmaceutical preparation.
16. The use of a preparation according to any one of claims 13 to 15 for producing a medicament for the treatment of patients suffering from hemophilia A, phenotypical hemophilia and vWD.
17. A method according to claim 1, characterized in that one starts from plasma or from a plasma fraction and that the factor VIII/vWF-complex is obtained in an at least 300-fold purity and a yield of at least 50%, as compared to plasma.
18. A method of producing a factor VIII/vWF-complex preparation from plasma or from a plasma fraction, characterized in that plasma or a plasma fraction is contacted with a cation exchanger, the factor VIII/vWF-complex being adsorbed thereby, the cation exchanger loaded with factor VIII/vWF-complex optionally is washed, subsequently the factor VIII/vWF-complex is

eluted, an eluate being obtained which has an at least 300-fold purity as regards the factor VIII/vWF-complex and a yield of factor VIII/vWF-complex of at least 50%, based on plasma, and subsequently the obtained eluate is worked up to a factor VIII/vWF-complex-preparation.

19. A method according to claim 17, characterized in that eluting of the factor VIII/vWF-complex from the cation exchanger is carried out such that the obtained eluate contains factor VIII in a yield which amounts to at least 90% of the factor VIII-activity prior to adsorption on the cation exchanger.

20. A method according to claim 18 or 19, characterized in that when working up the factor VIII/vWF-preparation, no further chromatographic purification step is carried out.

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

PCT/AT 98 / 00043

Internationales Aktenzeichen

27. Feb. 1998

Internationales Anmeldedatum

Osterreichisches Patentamt **HABLECKE**
Einlauf- u. Abgangsstelle
A-1014 Wien, Kohnspergerplatz 10
Name des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
Fachinspektor

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) R 33814

Feld Nr. I. BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG
Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex mittels Kationenaustauscherchromatographie

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

KAXTEN

IMMUNO Aktiengesellschaft

Industriestraße 67,

A - 1221 Wien, Österreich (AT) *changed.*

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat): AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☒

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

MITTERER Artur

A - 2304 Mannsdorf 116

Österreich (AT)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐

alle Bestimmungsstaaten

☐

alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒

nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐

die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

SONN Helmut, PAWLOY Heinrich, WEINZINGER

Arnulf, PAWLOY Peter, ALGE Daniel

Riemergasse 14,

A - 1010 Wien, Österreich (AT)

Telefonnr.:

1-512 84 05

Telefaxnr.:

1-512 98 05

Fernschreibnr.:

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER	
Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.	
<p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> <p>FISCHER Bernhard Jägerhausgasse 14/11, A - 1120 Wien, Österreich (AT) <i>new address</i></p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> <p>SCHÖNBERGER Öyvind L. Schopenhauerstraße 52/7, A - 1180 Wien, Österreich (AT)</p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> <p>THOMAS-URBAN Kathrin Kartäuserstraße 149 D - 79104 Freiburg, Deutschland (DE)</p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): AU	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</p> <p>DORNER Friedrich Peterlinigasse 17, A - 1230 Wien, Österreich (AT)</p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): AT	Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><input checked="" type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.</p>	

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

EIBL Johann
Gustav-Tschermakgasse 2,
A - 1180 Wien, Österreich (AT)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

LINNAU Yendra
Lavendelweg 24,
A - 1224 Wien, Österreich (AT)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

SCHÖNHOFER Wolfgang
Ringelrätzgasse 5/C1,
A - 3100 St. Pölten, Österreich (AT)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☐ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

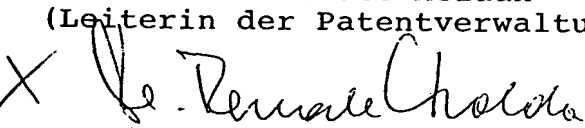
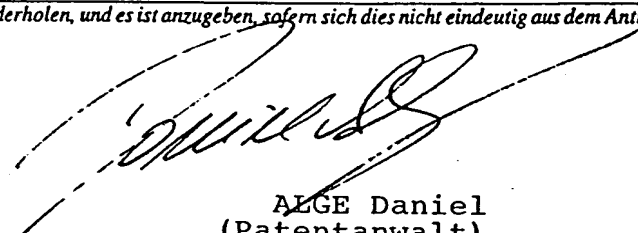
Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik
Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> IS Island | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH		Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. <input type="checkbox"/>	
Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:			
Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) AT	27. Februar 1997 (27.02.1997)	A 338/97	
(2)			
(3)			
<p>Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):</p> <p><input type="checkbox"/> Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.</p>			
Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE			
<p>Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt): ISA / _____</p> <p>Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.</p> <p>Staat (oder regionales Amt): _____ Datum (Tag/Monat/Jahr) : _____ Aktenzeichen: _____</p>			
Feld Nr. VIII KONTROLLISTE			
<p>Diese internationale Anmeldung umfaßt:</p> <p>1. Antrag : 5 Blätter</p> <p>2. Beschreibung : 18 Blätter</p> <p>3. Ansprüche : 3 Blätter</p> <p>4. Zusammenfassung : 1 Blätter</p> <p>5. Zeichnungen : 2 Blätter</p> <p>Insgesamt : 29 Blätter</p>		<p>Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Unterzeichnete gesonderte Vollmachten folgen</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):</p> <p>5. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung</p> <p>6. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen</p> <p>7. <input type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)</p> <p>8. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzeln aufführen): Postempfangschein</p>	
Abbildung Nr. <u>1</u> der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.			
Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS			
<p>Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.</p> <p style="text-align: center;">Renate Moldan (Leiterin der Patentverwaltung)</p> <p> </p> <p>IMMUNO AKTIENGESellschaft ALGE Daniel (Patentanwalt)</p>			

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: ISA / _____	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro: _____

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An

Sonn, Pawloy, Weinzing,er,
Pawloy & Alge
Riemergasse 14
A - 1010 Wien
AUSTRIA

EINGELANGT

06. Juli 1998

FRIST: 3.9.98

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)

1. 3. 8. 27. 8. mb

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

03/07/1998

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

R 33814

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkt 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 98/00043

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

27/02/1998

Anmelder

IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al.

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind die Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird.

3. ☐ Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. Weiteres Vorgehen: Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von 18 Monaten seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis 90^{ter} 3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von 20 Monaten seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Dominique Parijs

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen. Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen die anderen Ansprüche nicht neu nummeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
"Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigelegt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 62.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts R 33814	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/AT 98/ 00043	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/02/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 27/02/1997
Anmelder IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
 - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
 - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
 - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
 - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung
 - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
 - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:
Abb. Nr. _____
 - ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen
 - ☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
 - ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.☒ keine der Abb.

PCT/AT 98/00043

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K14/755 A61K38/37

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 600 480 A (SCLAVO SPA ; AIMA DERIVATI SPA (IT)) 8. Juni 1994 siehe Ansprüche; Beispiel	1,5,6, 8-17
A	WO 93 15199 A (RHONE POULENC RORER SA) 5. August 1993 siehe Ansprüche; Beispiel 7	1,9
A	WO 91 13093 A (BIO TECHNOLOGY GENERAL CORP) 5. September 1991 siehe Ansprüche; Beispiel 4	1,9
X	EP 0 295 645 A (ZYMOGENETICS INC) 21. Dezember 1988 siehe Seite 5, Zeile 49 - Seite 6, Zeile 3; Ansprüche 10-13; Beispiel 5	1,9,10, 13-16
	--- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Juni 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/07/1998

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 97 34930 A (IMMUNO AG ; FISCHER BERNHARD (AT); MITTERER ARTUR (AT); DORNER FRIE) 25.September 1997 siehe Ansprüche; Beispiele ----	1,9-16
P,X	WO 97 39033 A (IMMUNO AG ; SCHOENHOFER WOLFGANG (AT); EIBL JOHANN (AT); WEBER ALFR) 23.Oktober 1997 siehe Ansprüche; Beispiele -----	1,9-16

INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 98/00043

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0600480	A	08-06-1994	IT	1256622 B	12-12-1995
WO 9315199	A	05-08-1993	FR	2686899 A	06-08-1993
			EP	0624195 A	17-11-1994
			FI	943563 A	29-07-1994
			JP	7503368 T	13-04-1995
WO 9113093	A	05-09-1991	AU	645077 B	06-01-1994
			AU	7496491 A	18-09-1991
			CA	2077446 A	03-09-1991
			EP	0517826 A	16-12-1992
			FI	923935 A	02-09-1992
EP 0295645	A	21-12-1988	US	5200510 A	06-04-1993
			DK	331488 A	17-12-1988
			JP	1100196 A	18-04-1989
WO 9734930	A	25-09-1997	AT	403764 B	25-05-1998
			AT	49496 A	15-10-1997
WO 9739033	A	23-10-1997	AT	403765 B	25-05-1998
			AT	66796 A	15-10-1997



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

PCT

An

Sonn, Pawloy, Weinzing,
 Pawloy & Alge
 Riemergasse 14
 A - 1010 Wien
 AUSTRIA

EINGELANGT

06. Juli 1998

FRIST 3.9.98

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)
von 3.8. 27.8. mb f.

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

03/07/1998

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

R 33814

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkt 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 98/00043

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

27/02/1998

Anmelder

IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al.

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind die Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird.

3. ☐ Hinsichtlich des Widerspruchs gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungssämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis 90.3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungssämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Dominique Parijs

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.

Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z. B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu numerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu numeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu numerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigelegt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 52.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts R 33814	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/AT 98/ 00043	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/02/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 27/02/1997
Anmelder IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,

☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.

☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,

☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.

☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:

Abb. Nr. ☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K14/755 A61K38/37

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 600 480 A (SCLAVO SPA ; AIMA DERIVATI SPA (IT)) 8. Juni 1994 siehe Ansprüche; Beispiel	1, 5, 6, 8-17
A	WO 93 15199 A (RHONE POULENC RORER SA) 5. August 1993 siehe Ansprüche; Beispiel 7	1, 9
A	WO 91 13093 A (BIO TECHNOLOGY GENERAL CORP) 5. September 1991 siehe Ansprüche; Beispiel 4	1, 9
X	EP 0 295 645 A (ZYMOGENETICS INC) 21. Dezember 1988 siehe Seite 5, Zeile 49 - Seite 6, Zeile 3; Ansprüche 10-13; Beispiel 5	1, 9, 10, 13-16
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Juni 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

03/07/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fuhr, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO 97 34930 A (IMMUNO AG ;FISCHER BERNHARD (AT); MITTERER ARTUR (AT); DORNER FRIE) 25.September 1997 siehe Ansprüche; Beispiele ---	1,9-16
P,X	WO 97 39033 A (IMMUNO AG ;SCHOENHOFER WOLFGANG (AT); EIBL JOHANN (AT); WEBER ALFR) 23.Oktober 1997 siehe Ansprüche; Beispiele -----	1,9-16

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ationales Aktenzeichen

PCT/AT 98/00043

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0600480	A	08-06-1994	IT	1256622 B	12-12-1995
WO 9315199	A	05-08-1993	FR	2686899 A	06-08-1993
			EP	0624195 A	17-11-1994
			FI	943563 A	29-07-1994
			JP	7503368 T	13-04-1995
WO 9113093	A	05-09-1991	AU	645077 B	06-01-1994
			AU	7496491 A	18-09-1991
			CA	2077446 A	03-09-1991
			EP	0517826 A	16-12-1992
			FI	923935 A	02-09-1992
EP 0295645	A	21-12-1988	US	5200510 A	06-04-1993
			DK	331488 A	17-12-1988
			JP	1100196 A	18-04-1989
WO 9734930	A	25-09-1997	AT	403764 B	25-05-1998
			AT	49496 A	15-10-1997
WO 9739033	A	23-10-1997	AT	403765 B	25-05-1998
			AT	66796 A	15-10-1997

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SONN, Helmut
Riemergasse 14
A-1010 Wien
AUTRICHE

Date of mailing (day/month/year)

03 September 1998 (03.09.98)

Applicant's or agent's file reference

R 33814

IMPORTANT NOTICE

International application No.

PCT/AT98/00043

International filing date (day/month/year)

27 February 1998 (27.02.98)

Priority date (day/month/year)

27 February 1997 (27.02.97)

Applicant

IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU, BR, CA, EP, IL, JP, NO, PL, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CZ, HU, MX, RU, SI, SK

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on

03 September 1998 (03.09.98) under No. WO 98/38220

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

J. Zahra

Telephone No. (41-22) 338.83.38



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SONN, Helmut
Rienmeggstr. 17
A-1010 Wien
AUTRICHEEINGELANGT
15. Okt. 1998
FRIST:

Date of mailing (day/month/year) 09 October 1998 (09.10.98)		
Applicant's or agent's file reference R 33814		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/AT98/00043	International filing date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.98)	Priority date (day/month/year) 27 February 1997 (27.02.97)
Applicant IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : AU, BR, CA, CZ, IL, JP, NO, PL, RU, SK, US

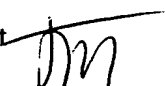
2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

National : HU, MX, SI

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" **before the expiration of 30 months from the priority date** before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed **until 31 months from the priority date** for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

<p>The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer:</p> <p>Jocelyne Rey-Millet </p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
---	--

EINGELANGT PATENT COOPERATION TREATY

13. Juli 1998

PCT

FRIST:

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SONN, Helmut
Riemergasse 14
A-1010 Wien
AUTRICHE

Date of mailing (day/month/year) 06 July 1998 (06.07.98)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference R 33814	
International application No. PCT/AT98/00043	International filing date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.98)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address LINNAU, Yendra Lavendelweg 24 A-1224 Wien and SCHÖNHOFER, Wolfgang Ringelnatzgasse 5/C1 A-3100 St. Pölten: Austria	State of Nationality AT	State of Residence AT
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

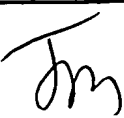
Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

The applicants/inventors identified in Box 1. should be deleted of record.

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colmbettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Jocelyne Rey-Millet  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	---

DIPL.-ING. GUSTAV WOLFRAM † (1998)
DR. PHIL. HEINRICH PAWLOY
DIPL.-ING. HELMUT SONN
DIPL.-ING. ARNULF WEINZINGER
DIPL.-ING. PETER PAWLOY
MAG. DR. RER. NAT. DANIEL ALGE

Einschreiben !

The International Bureau of WIPO

34, chemin des Colombettes
CH-1211 Geneva 20
Switzerland

Wien, 16. Juni 1999

Internationale Patentanmeldung Nr. PCT/AT98/00043 (WO 98/38220)
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al.
Unser Zeichen: R 33814/Bi

Unter Bezugnahme auf unser Schreiben vom 16. Juni 1999 wird gebeten, die Adresse des Erfinders und (Mit-)Anmelders für USA, Bernhard FISCHER, korrekterweise in

Wilhelminenstraße 95/C/17
A-1160 Wien (AT)

zu ändern. Leider wurde im Schreiben vom 16. Juni die Strasse fehlerhaft angegeben.

Es wird gebeten, diese Änderung gemäß Regel 92bis vorzunehmen bzw. um dringende Übersendung der amtlichen Bestätigung über die erfolgte Änderung wird gebeten.

Ferner wird gebeten, das Einlangen dieser Sendung zu bestätigen.

Die Vertreter:

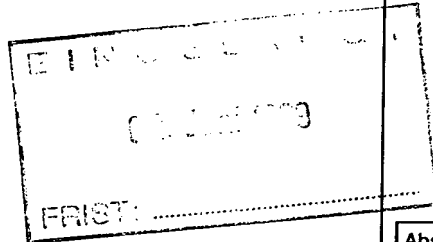
Dr. Daniel Alge
Patentanwalt

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

SONN, Helmut
Riemergasse 14
A-1010 Wien
AUTRICHE



PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

28.05.99

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
R 33814

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/AT98/00043

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
27/02/1998

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
27/02/1997

Anmelder

IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d
Fax: (+49-89) 2399-4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Peralt Lappas, R

Tel. (+49-89) 2399-8052



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts R 33814	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/AT98/00043	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/02/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 27/02/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K14/755		
Anmelder IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
- ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
- Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 19/09/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 28.09.99
Nam und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter Haile, F Tel. Nr. (+49-89) 2399 8537 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/AT98/00043

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-18 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-16 eingegangen am 19/09/1998 mit Schreiben vom 17/09/1998

Zeichnungen, Blätter:

1/2,2/2 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde (siehe insbesondere Beschreibung, Seite 3, Absätze 2-5) ein Verfahren und den daraus resultierenden Faktor VIII/vWF-Komplex mit einer verbesserten spezifischen Aktivität und Stabilität zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgabe wurde mittels einem Verfahren, gekennzeichnet durch einen Kationenaustauscher und eine stufenweise Elution, gelöst. Um die verbesserte spezifische Aktivität zu erlangen sollten bei der Gewinnung des Komplexes niedermolekulare vWF-Multimere abgetrennt werden; die dadurch erhaltenen Komplexe sind gekennzeichnet durch ihre mit überwiegend hochmolekularen vWF-Multimeren zusammengesetzte Struktur und den davon ausgehenden Effekt der erhöhten spezifischen vWF-Aktivität. Außerdem werden durch dieses Verfahren kontaminierende Substanzen entfernt die üblicherweise in Plasmafraktionen enthalten sind.

Im Hinblick auf den Stand der Technik wird dem Gegenstand der Ansprüche 1-16 Neuheit und erfinderische Tätigkeit anerkannt (Artikel 33(2)(3), Regel 64.1, 65 PCT). Das vorliegende Verfahren und Produkt gekennzeichnet durch den Kationenaustauscher, die stufenweise Elution und die hochmolekularen vWF-Multimeren sind nicht durch den Stand der Technik vorweggenommen und auch nicht für die Fachperson als naheliegend anzusehen.

Diesem Bericht liegt die Annahme zugrunde, daß alle Ansprüche die Priorität des Anmeldetags des Prioritätsdokuments genießen: in diesem Fall gehören WO 97/34930 und WO 97/39033, gekennzeichnet im internationalen Recherchenbericht als P,X-Dokumente, nicht zum Stand der Technik (siehe auch Punkt VI).

Zu Punkt VI

Auf WO 97/34930 und WO 97/39033 wird nach Regel 70.10 PCT hingewiesen.

Zu Punkt VIII

Die in den unabhängigen Ansprüchen benutzten Ausdrücke "insbesondere" und

"im wesentlichen frei von" lassen den Leser über die Bedeutung der betreffenden angeführten technischen Merkmale im Ungewissen. Der Gegenstand für den Schutz begehrt wird sowie die Abgrenzung der Erfindung gegenüber dem Stand der Technik scheinen daher nicht klar genug aus diesen Ansprüchen hervor zu gehen (Artikel 6 und Regel 6.3 PCT).

Das im Recherchenbericht genannte Dokument EP-A-0 295 645, aus dem sich der zugrundeliegende Stand der Technik ergibt, ist nicht in der Beschreibung angegeben (Regel 5.1(a)(ii) PCT).

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Kationenaustauscher gebunden und durch stufenweise Elution Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, gewonnen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex bei einer Salzkonzentration von ≤ 250 mM an einen Kationenaustauscher gebunden wird und Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere, Faktor VIII frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität und Faktor VIII:C bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM eluiert und gewonnen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, durch stufenweise Fraktionierung bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM, vorzugsweise ≥ 350 mM gewonnen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Fraktion gewonnen wird, die insbesondere frei ist von niedermolekularen vWF-Multimeren und vWF-Abbauprodukten, nicht-komplexierten, oder schwach an vWF gebundenem Faktor VIII und kontaminierenden Nukleinsäuren.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution der Polypeptide vom Kationenaustauscher in einem Puffersystem mit einem pH-Wert im Bereich zwischen 4,5 und 8,5, vorzugsweise $\geq 7,1$ und $\leq 8,5$ erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Kationenaustauscher ein Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen konjugierte Träger ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend insbeson-

dere hochmolekulare vWF-Multimere gewonnen wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus Plasma, einer Plasmafraktion, Kryopräzipitat, dem zellfreien Überstand oder Extrakt einer rekombinanten Zellkultur, oder einer angereicherten Proteinfraction gewonnen wird.

9. Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie.

10. Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß er insbesondere frei ist von niedermolekularen vWF-Multimeren, inaktiven vWF-Abbauprodukten und Faktor VIII frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität und von Faktor VIIIA-Aktivität.

11. Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß er eine spezifische vWF-Aktivität von mindestens 66 U/mg Protein und eine spezifische Faktor VIII-Aktivität von mindestens 500 U/mg Protein aufweist.

12. Faktor VIII:C im wesentlichen frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie und stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 200 mM und ≤ 300 mM.

13. Präparation enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex oder Faktor VIII:C gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie virussicher und frei von infektiösem Material ist.

14. Präparation nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer lagerstabilen Form vorliegt.

15. Präparation nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch ge-

kennzeichnet, daß sie als pharmazeutisches Präparat formuliert ist.

16. Verwendung einer Präparation nach einem der Ansprüche 13 bis 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit Hämophilie A, phänotypischer Hämophilie und vWD.

DIPL.-ING. GUSTAV WOLFRAM † (1998)
DR. PHIL. HEINRICH PAWLOY
DIPL.-ING. HELMUT SONN
DIPL.-ING. ARNULF WEINZINGER
DIPL.-ING. PETER PAWLOY
MAG. DR. RER. NAT. DANIEL ALGE

By Telefax + Confirmation Copy !

International Bureau of WIPO
PCT Administration Office Section

34, chemin des Colombettes
CH-1211 Geneva 20
Switzerland

URGENT!!!

Vienna, 21 July 1999

International Patent Application PCT/AT98/00043
International Filing Date: 27 February 1998
Agent's file reference: R 33814, Bi

According to Rule 92bis PCT it is kindly requested to change the applicants data for all designated states except the United States of America from Immuno Aktiengesellschaft to

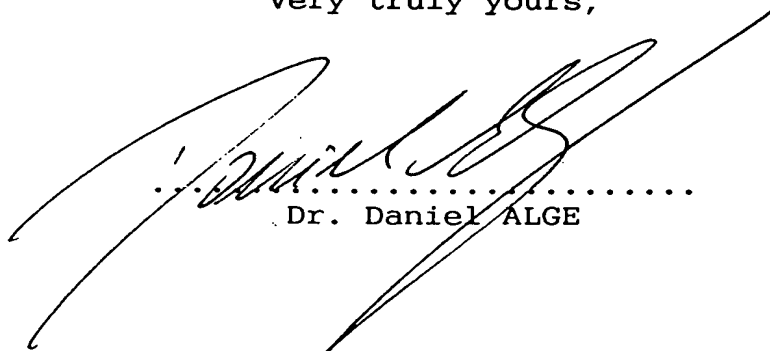
BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT

the address remaining the same, namely

Industriestrasse 67
A-1221 Wien (AT)

Please, take **urgently** note and record the change of the applicants data and provide for notification to the elected Offices by August 27, 1999.

Very truly yours,



.....
Dr. Daniel ALGE

By mail:
-Power of Attorney

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
PCT/AT 98 / 00043	
Internationales Aktenzeichen	
Internationales Anmeldedatum 27. Feb. 1998	
Österreichisches Patentamt HABLECKER Einlauf- u. Abgangsstelle A-1014 Wien, Kohnmarkt 8-10 Fachinspektor	
Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht) (max. 12 Zeichen) R 33814	

Feld Nr. I. BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG
Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex mittels Kationenaustauscherchromatographie

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

IMMUNO Aktiengesellschaft
Industriestraße 67,
A - 1221 Wien, Österreich (AT) *changed*

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat): **AT**

Sitz oder Wohnsitz (Staat): **AT**

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ alle Bestimmungsstaaten ☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

MITTERER Artur
A - 2304 Mannsdorf 116
Österreich (AT)

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): **AT**

Sitz oder Wohnsitz (Staat): **AT**

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

SONN Helmut, **PAWLOY** Heinrich, **WEINZINGER** Arnulf, **PAWLOY** Peter, **ALGE** Daniel
Riemergasse 14,
A - 1010 Wien, Österreich (AT)

Telefonnr.:

1-512 84 05

Telefaxnr.:

1-512 98 05

Fernschreibnr.:

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

FISCHER Bernhard
Jägerhausgasse 14/11,
A - 1120 Wien, Österreich (AT) *new address*

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

SCHÖNBERGER Öyvind L.
Schopenhauerstraße 52/7,
A - 1180 Wien, Österreich (AT)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

THOMAS-URBAN Kathrin
Kartäuserstraße 149
D - 79104 Freiburg, Deutschland (DE)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): AU

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

DORNER Friedrich
Peterlinigasse 17,
A - 1230 Wien, Österreich (AT)

Diese Person ist:

- ☐ nur Anmelder
☒ Anmelder und Erfinder
☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): AT

Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

- ☐ alle Bestimmungsstaaten ☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika ☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika ☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER	
<i>Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.</i>	
<p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> <p>EIBL Johann Gustav-Tschermakgasse 2, A - 1180 Wien, Österreich (AT)</p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): AT	Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> <p>LINNAU Yendra Lavendelweg 24, A - 1224 Wien, Österreich (AT) <i>deleted!</i></p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): AT	Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> <p>SCHÖNHOFER Wolfgang Ringelrätzgasse 5/C1, A - 3100 St. Pölten, Österreich (AT) <i>deleted!</i></p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat): AT	Sitz oder Wohnsitz (Staat): AT
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p>	<p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p>
Staatsangehörigkeit (Staat):	Sitz oder Wohnsitz (Staat):
<p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p>	
<p><input type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.</p>	

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ AP ARIPO-Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ EA Eurasisches Patent: AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP Europäisches Patent: AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input type="checkbox"/> IS Island | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS Lesotho | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCHWeitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. ☐

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:

Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) AT	27. Februar 1997 (27.02.1997)	A 338/97	
(2)			
(3)			

Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):

☐ Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.
Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt):

ISA /

Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche soweit wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.

Staat (oder regionales Amt):

Datum (Tag/Monat/Jahr) :

Aktenzeichen:

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE

Diese internationale Anmeldung umfaßt:

1. Antrag : 5 Blätter
 2. Beschreibung : 18 Blätter
 3. Ansprüche : 3 Blätter
 4. Zusammenfassung : 1 Blätter
 5. Zeichnungen : 2 Blätter
 Insgesamt : 29 Blätter

Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1. ☒ Unterzeichnete gesonderte Vollmachten folgen 5. ☒ Blatt für die Gebührenberechnung
 2. ☐ Kopie der allgemeinen Vollmacht 6. ☐ Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen
 3. ☐ Begründung für das Fehlen der Unterschrift 7. ☐ Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren (Diskette)
 4. ☒ Prioritätsbeleg(e) (durch die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen): 8. ☒ Sonstige (einzeln aufführen): Postempfangschein

Abbildung Nr. 1 der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.**Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS**

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

Renate Moldan
 (Leiterin der Patentverwaltung)

X 

IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT


 ALGE Daniel
 (Patentanwalt)

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen: <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde: ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen

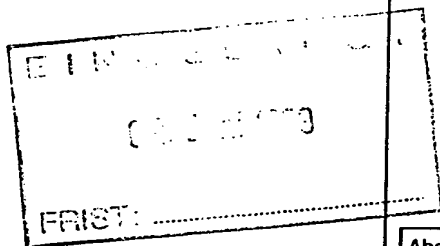
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

SONN, Helmut
Riemergasse 14
A-1010 Wien
AUTRICHE



PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS
(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

28.05.99

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
R 33814

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/AT98/00043

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
27/02/1998

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
27/02/1997

Anmelder
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al.

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung
beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d
Fax: (+49-89) 2399-4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Peralt Lappas, R

Tel. (+49-89) 2399-8052



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts R 33814	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/AT98/00043	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/02/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 27/02/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K14/755		
Anmelder IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al.		



1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☒ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 19/09/1998	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 28.05.99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+49-89) 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter Halle, F Tel. Nr. (+49-89) 2399 8537 

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/AT98/00043

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-18 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-16 eingegangen am 19/09/1998 mit Schreiben vom 17/09/1998

Zeichnungen, Blätter:

1/2,2/2 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-16
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-16
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-16
	Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VI. Bestimmte angeführte Unterlagen

1. Bestimmte veröffentlichte Unterlagen (Regel 70.10)

und / oder

2. Nicht-schriftliche Offenbarungen (Regel 70.9)

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Zu Punkt V

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde (siehe insbesondere Beschreibung, Seite 3, Absätze 2-5) ein Verfahren und den daraus resultierenden Faktor VIII/vWF-Komplex mit einer verbesserten spezifischen Aktivität und Stabilität zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgabe wurde mittels einem Verfahren, gekennzeichnet durch einen Kationenaustauscher und eine stufenweise Elution, gelöst. Um die verbesserte spezifische Aktivität zu erlangen sollten bei der Gewinnung des Komplexes niedermolekulare vWF-Multimere abgetrennt werden; die dadurch erhaltenen Komplexe sind gekennzeichnet durch ihre mit überwiegend hochmolekularen vWF-Multimeren zusammengesetzte Struktur und den davon ausgehenden Effekt der erhöhten spezifischen vWF-Aktivität. Außerdem werden durch dieses Verfahren kontaminierende Substanzen entfernt die üblicherweise in Plasmafraktionen enthalten sind.

Im Hinblick auf den Stand der Technik wird dem Gegenstand der Ansprüche 1-16 Neuheit und erfinderische Tätigkeit anerkannt (Artikel 33(2)(3), Regel 64.1, 65 PCT). Das vorliegende Verfahren und Produkt gekennzeichnet durch den Kationenaustauscher, die stufenweise Elution und die hochmolekularen vWF-Multimeren sind nicht durch den Stand der Technik vorweggenommen und auch nicht für die Fachperson als naheliegend anzusehen.

Diesem Bericht liegt die Annahme zugrunde, daß alle Ansprüche die Priorität des Anmeldetags des Prioritätsdokuments genießen: in diesem Fall gehören WO 97/34930 und WO 97/39033, gekennzeichnet im internationalen Recherchenbericht als P,X-Dokumente, nicht zum Stand der Technik (siehe auch Punkt VI).

Zu Punkt VI

Auf WO 97/34930 und WO 97/39033 wird nach Regel 70.10 PCT hingewiesen.

Zu Punkt VIII

Die in den unabhängigen Ansprüchen benutzten Ausdrücke "insbesondere" und

"im wesentlichen frei von" lassen den Leser über die Bedeutung der betreffenden angeführten technischen Merkmale im Ungewissen. Der Gegenstand für den Schutz begehrt wird sowie die Abgrenzung der Erfindung gegenüber dem Stand der Technik scheinen daher nicht klar genug aus diesen Ansprüchen hervor zu gehen (Artikel 6 und Regel 6.3 PCT).

Das im Recherchenbericht genannte Dokument EP-A-0 295 645, aus dem sich der zugrundeliegende Stand der Technik ergibt, ist nicht in der Beschreibung angegeben (Regel 5.1(a)(ii) PCT).

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Kationenaustauscher gebunden und durch stufenweise Elution Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, gewonnen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex bei einer Salzkonzentration von ≤ 250 mM an einen Kationenaustauscher gebunden wird und Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere, Faktor VIII frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität und Faktor VIII:C bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM eluiert und gewonnen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, durch stufenweise Fraktionierung bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM, vorzugsweise ≥ 350 mM gewonnen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Fraktion gewonnen wird, die insbesondere frei ist von niedermolekularen vWF-Multimeren und vWF-Abbauprodukten, nicht-komplexierten, oder schwach an vWF gebundenem Faktor VIII und kontaminierenden Nukleinsäuren.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution der Polypeptide vom Kationenaustauscher in einem Puffersystem mit einem pH-Wert im Bereich zwischen 4,5 und 8,5, vorzugsweise $\geq 7,1$ und $\leq 8,5$ erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Kationenaustauscher ein Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen konjugierte Träger ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend insbeson-

dere hochmolekulare vWF-Multimere gewonnen wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus Plasma, einer Plasmafraktion, Kryopräzipitat, dem zellfreien Überstand oder Extrakt einer rekombinanten Zellkultur, oder einer angereicherten Proteinfraction gewonnen wird.

9. Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie.

10. Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß er insbesondere frei ist von niedermolekularen vWF-Multimeren, inaktiven vWF-Abbauprodukten und Faktor VIII frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität und von Faktor VIIIa-Aktivität.

11. Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß er eine spezifische vWF-Aktivität von mindestens 66 U/mg Protein und eine spezifische Faktor VIII-Aktivität von mindestens 500 U/mg Protein aufweist.

12. Faktor VIII:C im wesentlichen frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie und stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 200 mM und ≤ 300 mM.

13. Präparation enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex oder Faktor VIII:C gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie virussicher und frei von infektiösem Material ist.

14. Präparation nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer lagerstabilen Form vorliegt.

15. Präparation nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch ge-

kennzeichnet, daß sie als pharmazeutisches Präparat formuliert ist.

16. Verwendung einer Präparation nach einem der Ansprüche 13 bis 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit Hämophilie A, phänotypischer Hämophilie und vWD.

09/423781

PATENTANWÄLTE - E

AN PATENT & TRADEMARK ATTORNEYS

SONN, PAWLOY, WEINZINGER & WOLFRAM

RIEMERGASSE 14 · A-1010 WIEN · ÖSTERREICH

TELEFON: (+43 1) 512 84 05 · TELEFAX: (+43 1) 512 98 05

E-MAIL: OFFICE@SONN.AT

423781 PCT/PTO 12 NOV 1999

DIPL.-ING. GUSTAV WOLFRAM † (1998)

DR. PHIL. HEINRICH PAWLOY

DIPL.-ING. HELMUT SONN

DIPL.-ING. ARNULF WEINZINGER

DIPL.-ING. PETER PAWLOY

MAG. DR. RER. NAT. DANIEL ALGE

By Telefax + Confirmation Copy !International Bureau of WIPO
PCT Administration Office Section34, chemin des Colombettes
CH-1211 Geneva 20
Switzerland**URGENT!!!**

Vienna, 21 July 1999

International Patent Application PCT/AT98/00043
International Filing Date: 27 February 1998
Agent's file reference: R 33814, Bi

According to Rule 92bis PCT it is kindly requested to change the applicants data for all designated states except the United States of America from Immuno Aktiengesellschaft to

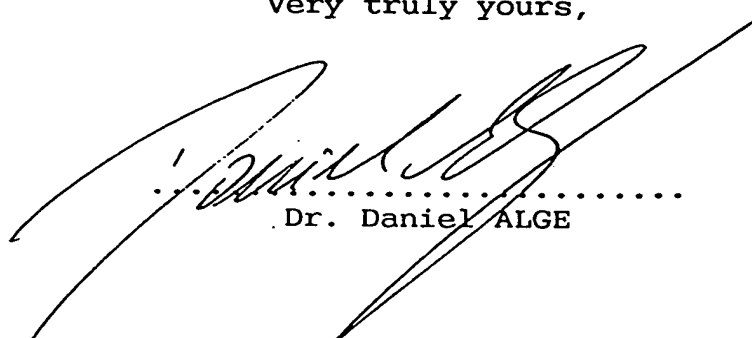
BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT

the address remaining the same, namely

Industriestrasse 67
A-1221 Wien (AT)

Please, take urgently note and record the change of the applicants data and provide for notification to the elected Offices by August 27, 1999.

Very truly yours,



.....
Dr. Daniel ALGE

By mail:
-Power of Attorney

2000 2001

SONN, PAWLOY, WEINZINGER & WOLFRAM

RIEMERGASSE 14 · A-1010 WIEN · ÖSTERREICH

TELEFON: (+43 1) 512 84 05 · TELEFAX: (+43 1) 512 98 05

E-MAIL: OFFICE@SONN.AT

DIPL.-ING. GUSTAV WOLFRAM † (1998)
DR. PHIL. HEINRICH PAWLOY
DIPL.-ING. HELMUT SONN
DIPL.-ING. ARNULF WEINZINGER
DIPL.-ING. PETER PAWLOY
MAG. DR. RER. NAT. DANIEL ALGE

Einschreiben !

The International Bureau of WIPO

34, chemin des Colombettes
CH-1211 Geneva 20
Switzerland

Wien, 16. Juni 1999

Internationale Patentanmeldung Nr. PCT/AT98/00043 (WO 98/38220)
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al.
Unser Zeichen: R 33814/Bi

Unter Bezugnahme auf unser Schreiben vom 16. Juni 1999 wird gebeten, die Adresse des Erfinders und (Mit-)Anmelders für USA, Bernhard FISCHER, korrekterweise in

Wilhelminenstraße 95/C/17
A-1160 Wien (AT)

zu ändern. Leider wurde im Schreiben vom 16. Juni die Strasse fehlerhaft angegeben.

Es wird gebeten, diese Änderung gemäß Regel 92bis vorzunehmen bzw. um dringende Übersendung der amtlichen Bestätigung über die erfolgte Änderung wird gebeten.

Ferner wird gebeten, das Einlangen dieser Sendung zu bestätigen.

Die Vertreter:


Dr. Daniel Alge
Patentanwalt

PCT

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SONN, Helmut
Riemergasse 14
A-1010 Wien
AUTRICHE

Date of mailing (day/month/year) 03 September 1998 (03.09.98)		
Applicant's or agent's file reference R 33814		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/AT98/00043	International filing date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.98)	Priority date (day/month/year) 27 February 1997 (27.02.97)
Applicant IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:

AU, BR, CA, EP, IL, JP, NO, PL, US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

CZ, HU, MX, RU, SI, SK

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
✓ 03 September 1998 (03.09.98) under No. WO 98/38220

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

<p style="text-align: center;">The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland</p> <p>Facsimile No. (41-22) 740.14.35</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center;">J. Zahra</p> <p>Telephone No. (41-22) 338.83.38</p>
--	--

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

To:

SONN, Helmut
Rienbooss 14
A-1015 Wien
AUTRICHEENGELANGT
15. Okt. 1998
FRIST:

Date of mailing (day/month/year) 09 October 1998 (09.10.98)		
Applicant's or agent's file reference R 33814		IMPORTANT INFORMATION
International application No. PCT/AT98/00043	International filing date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.98)	Priority date (day/month/year) 27 February 1997 (27.02.97)
Applicant IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : AU, BR, CA, CZ, IL, JP, NO, PL, RU, SK, US

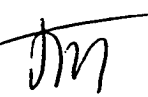
2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

National : HU, MX, SI

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer: Jocelyne Rey-Millet  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

EINGELANGT 13. Juli 1998 PCT FRIST: PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SONN, Helmut
 Riemergasse 14
 A-1010 Wien
 AUTRICHE

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
 Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 06 July 1998 (06.07.98)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference R 33814	
International application No. PCT/AT98/00043	International filing date (day/month/year) 27 February 1998 (27.02.98)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☒ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address LINNAU, Yendra Lavendelweg 24 A-1224 Wien and SCHÖNHOFER, Wolfgang Ringelratzgasse 5/C1 A-3100 St. Pölten: Austria	State of Nationality AT	State of Residence AT
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

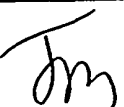
☐ the person
 ☐ the name
 ☐ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:
The applicants/inventors identified in Box 1. should be deleted of record.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
 ☐ the designated Offices concerned
☒ the International Searching Authority
 ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority
 ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Jocelyne Rey-Millet  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/755, A61K 38/37		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/38220
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. September 1998 (03.09.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT98/00043		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CZ, HU, IL, JP, MX, NO, PL, RU, SI, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 27. Februar 1998 (27.02.98)			
(30) Prioritätsdaten: A 338/97 27. Februar 1997 (27.02.97) AT		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IMMUNO AKTIENGESSELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MITTERER, Artur [AT/AT]; A-2304 Mannsdorf 116 (AT). FISCHER, Bernhard [DE/AT]; Jägerhausgasse 14/11, A-1120 Wien (AT). SCHÖNBERGER, Öyving, L. [DE/AT]; Schopenhauerstrasse 52/7, A-1180 Wien (AT). THOMAS-URBAN, Kathrin [AU/DE]; Kartäuserstrasse 149, D-79104 Freiburg (DE). DORNER, Friedrich [AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT). EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav-Tschermakgasse 2, A-1180 Wien (AT).			
(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).			
(54) Title: METHOD FOR PURIFYING FACTOR VIII/vWF COMPLEX BY CATION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REINIGUNG VON FAKTOR VIII/vWF-KOMPLEX MITTELS KATIONENAUSTAUSCHER-CHROMATOGRAPHIE			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to a method for obtaining factor VIII/vWF complex, characterized in that factor VIII/vWF complex from a protein solution is bonded with a cation-exchanger and factor VIII/vWF complex especially containing vWF multimers of high molecular weight is obtained by gradual elution. The invention also relates to a factor VIII/vWF complex which can be obtained by cation-exchange chromatography.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Beschrieben wird ein Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex, welches sich dadurch auszeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Kationenaustauscher gebunden und durch stufenweise Elution Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, gewonnen wird, sowie ein Faktor VIII/vWF-Komplex, erhältlich mittels Kationenaustauscherchromatographie.</p>			



WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

**INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)**

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07K 14/755, A61K 38/37</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/38220</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. September 1998 (03.09.98)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT98/00043</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 27. Februar 1998 (27.02.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: A 338/97 27. Februar 1997 (27.02.97) AT</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MITTERER, Artur [AT/AT]; A-2304 Mannsdorf 116 (AT). FISCHER, Bernhard [DE/AT]; Jägerhausgasse 14/11, A-1120 Wien (AT). SCHÖNBERGER, Öyving, L. [DE/AT]; Schopenhauerstrasse 52/7, A-1180 Wien (AT). THOMAS-URBAN, Kathrin [AU/DE]; Kartäuserstrasse 149, D-79104 Freiburg (DE). DORNER, Friedrich [AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT). EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav-Tschermakgasse 2, A-1180 Wien (AT).</p> <p>(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CZ, HU, IL, JP, MX, NO, PL, RU, SI, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p style="font-size: 1.2em; margin-left: 20px;"><i>changed</i></p> <p style="margin-left: 20px;"><i>new address</i></p>	
<p>(54) Title: METHOD FOR PURIFYING FACTOR VIII/VWF COMPLEX BY CATION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REINIGUNG VON FAKTOR VIII/VWF-KOMPLEX MITTELS KATIONENAUSTAUSCHER-CHROMATOGRAPHIE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a method for obtaining factor VIII/vWF complex, characterized in that factor VIII/vWF complex from a protein solution is bonded with a cation-exchanger and factor VIII/vWF complex especially containing vWF multimers of high molecular weight is obtained by gradual elution. The invention also relates to a factor VIII/vWF complex which can be obtained by cation-exchange chromatography.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Beschrieben wird ein Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex, welches sich dadurch auszeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Kationenaustauscher gebunden und durch stufenweise Elution Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, gewonnen wird, sowie ein Faktor VIII/vWF-Komplex, erhältlich mittels Kationenaustauscherchromatographie.</p>		

Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex
mittels Kationenaustauscherchromatographie

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex aus einem biologischen Ausgangsmaterial mittels Kationenaustauscherchromatographie und stufenweiser Elution, sowie gereinigten Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekularen vWF-Multimeren, enthält.

Im Plasma zirkuliert der von Willebrand-Faktor in einer Konzentration von 5 bis 10 mg/l und zum größten Teil in Form eines nicht-kovalent gebundenen Komplexes mit Faktor VIII. Im Kryopräzipitat ist Faktor VIII/vWF-Komplex stark angereichert und kann daraus oder aus Plasma oder Plasmafraktionen mit bekannten Fraktionierungsverfahren isoliert werden.

Bei der Hämophilie ist die Blutgerinnung durch Mangel an bestimmten plasmatischen Blutgerinnungsfaktoren gestört. Bei der Hämophilie A beruht die Blutungsneigung auf einem Mangel an Faktor VIII bzw. vWF (phänotypische Hämophilie). Die Behandlung der Hämophilie A erfolgt in erster Linie durch Ersatz des fehlenden Gerinnungsfaktors durch Faktorenkonzentrate z.B. durch Infusion von Faktor VIII oder Faktor VIII/vWF-Komplex.

Für den Einsatz zur Therapie von Patienten mit Hämophilie A, aber auch von von Willebrand-Syndrom ist ein gereinigter Faktor VIII, komplexiert mit vWF, wünschenswert (Berntorp, 1994, Haemostasis 24:289-297). Insbesondere wird immer wieder betont, daß in Präparaten ohne oder nur einem geringen Gehalt an vWF, eine verlängerte Blutungszeit und eine geringe Faktor VIII:C-Halbwertszeit in vivo zu beobachten ist. Eine Normalisierung von vWF in vivo ist wichtig, um eine Konzentration von Faktor VIII im Plasma sowohl durch Reduktion der Faktor VIII-Eliminierungsrate als auch durch Unterstützung der Freisetzung von endogenem Faktor VIII, aufrecht zu erhalten (Lethagen et al., 1992, Ann. Hematol. 65: 253-259).

Die DE 3 504 385 beschreibt die Durchführung einer Ionenaustauscherchromatographie zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex, wobei der Faktor VIII-Komplex über Sulfatgruppen gebunden und mit Citratpuffer, Calciumchlorid und NaCl-Gradient eluiert wird. Der Faktor VIII/vWF-Komplex wird dabei mit einer Konzentration von 0,5 M NaCl vom Träger eluiert.

Die EP 0 416 983 beschreibt die Gewinnung des Faktor VIII/vWF-Komplexes aus menschlichem Plasma durch eine Kombination aus Bariumchlorid- oder Aluminiumhydroxid-Fällung und Anionen-Austauscherchromatographie an DEAE-Fractogel.

Harrison et al. (Thrombosis Res., 1988; 50, 295-304) beschreibt die Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex durch Chromatographie an Dextran-Sulfat-Sepharose.

Die EP 0 600 480 beschreibt ein Aufreinigungsverfahren für Faktor VIII/vWF-Komplex aus Vollplasma mittels kombinierter Anionenaustauscher/Kationenaustauscher-Chromatographie. Die Elution des an den Kationenaustauscher adsorbierten FVIII/vWF-Komplexes erfolgt dabei unter Verwendung eines Ca-haltigen Puffers mit 0,3 M NaCl in einem pH-Bereich zwischen 6,6 bis 7,0.

Die WO 96/10584 beschreibt ein Verfahren zur Gewinnung von hochreinem rekombinantem vWF mittels kombinierter Anionenaustauscher/Heparin-Affinitätschromatographie und die EP 0 705 846 die Trennung zwischen hoch- und niedermolekularen Fraktionen von rekombinantem vWF mittels Heparin-Affinitätschromatographie.

Die im Stand der Technik beschriebenen Faktor VIII-Präparate enthalten zwar zum größten Teil das gesamte vWF-Multimerpattern, jedoch variieren sie im Anteil an hochmolekularen vWF (HMW-vWF) und niedermolekularen vWF (LMW-vWF) und weisen auch sogenannte Triplett-Strukturen auf, die auf einen proteolytischen Abbau, insbesondere von HMW-vWF, hinweisen. Die Stabilität dieser Präparate ist dadurch oft begrenzt.

Es wird immer wieder betont, daß Faktor VIII/vWF-Präparationen, enthaltend im wesentlichen HMW-vWF, möglicherweise einen guten

Einfluß auf die Blutungszeit hätten, da sie die primäre Funktion des vWF, die Plättchenagglutination, ausführen und eine höhere Affinität zu den Plättchenrezeptoren Glykoprotein IB und IIb/IIIa haben als niedermolekulare vWF-Multimere.

Es besteht ein Bedarf an einem Faktor VIII-Komplex mit einer ausreichenden spezifischen Aktivität an Faktor VIII:C- und vWF-Aktivität. Ein Problem bei der Gewinnung eines solchen Komplexes ist insbesondere die Abtrennung von Molekülen enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere und Anreicherung von Komplexen mit hoher spezifischer vWF-Aktivität.

Ziel der vorliegenden Erfindung ist es daher, einen Faktor VIII/vWF-Komplex mit einer verbesserten spezifischen Aktivität und Stabilität zur Verfügung zu stellen.

Ein weiteres Ziel ist es, ein Verfahren zur Gewinnung eines solchen Faktor VIII/vWF-Komplex zur Verfügung zu stellen. Das Verfahren sollte sowohl für die Reinigung von rekombinantem als auch plasmatischem Faktor VIII/vWF-Komplex einsetzbar sein.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex zur Verfügung gestellt wird, bei dem Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Kationenaustauscher gebunden wird und durch stufenweise, fraktionierte Elution Faktor VIII/vWF-Komplex mit verbesserter spezifischer vWF-Aktivität gewonnen wird. Die Gewinnung und Anreicherung von Faktor VIII/vWF mit verbesserter Aktivität und Stabilität erfolgt insbesondere dadurch, daß Faktor VIII/vWF-Komplex bei einer niedrigen Salzkonzentration gebunden wird, durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration Fraktionen enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex mit niedermolekularen vWF-Multimeren, inaktiven vWF-Abbauprodukten und unspezifische Begleitproteine bei einer mittleren Salzkonzentration abgetrennt und Fraktionen enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, bei einer höheren Salzkonzentration gewonnen werden.

Faktor VIII/vWF-Komplex wird üblicherweise aufgrund seines sau-

ren isoelektrischen Punktes (IEP = 5,5 bis 6) und seiner daraus resultierenden negativen Netto-Ladung im schwach sauren bis basischen Milieu über positiv geladene Anionenaustauscher aufgereinigt. Es war daher aufgrund der bisher beschriebenen Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex mittels positiv geladener Anionenaustauscher nicht zu erwarten, daß Faktor VIII/vWF-Komplex ebenfalls bei einem pH-Wert, der oberhalb des IEP des Komplexes liegt, und niedriger Salzkonzentration an eine negativ geladene Gelmatrix eines Kationenaustauschers bindet und von dieser durch Erhöhung der Salzkonzentration selektiv eluierbar ist. Es war ebenfalls nicht zu erwarten, daß durch stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration von ungefähr zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM unspezifische Begleitproteine, inaktive vWF-Abbauprodukte, Komplexkomponenten mit geringer spezifischer Aktivität, Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere, nicht-komplexierter oder nur schwach gebundener Faktor VIII und freier Faktor VIII eluiert werden und bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM insbesondere Faktor VIII/vWF-Komplex mit hochmolekularen vWF-Multimere erhalten werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren, ausgehend von einem unreinen biologischen Material, gereinigte Fraktionen erhalten werden, die im wesentlichen frei von kontaminierenden Nukleinsäuren sind. Dadurch werden durch das Verfahren auch Nukleinsäuren aus Proteinpräparationen entfernt. Dieser Effekt kann mit herkömmlichen Verfahren mittels Anionenaustauscher nicht gezeigt werden, da Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung an den Anionenaustauscher binden, sich durch Erhöhung der Salzkonzentration wieder vom Anionenaustauscher ablösen und ins Eluat gelangen.

Bei der Reinigung des Faktor VIII/vWF-Komplexes ist insbesondere zu beachten, daß, bedingt durch die Größe des vWF von 500 000 bis mehrere Millionen, nur solche Trägermaterialien gute Reinigungen und Ausbeuten liefern, die den Faktor VIII/vWF-Komplex in der Diffusion und Verteilung in den verwendeten Trägermaterialien nicht behindern. Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex mit hoher spezifischer Aktivität mittels Kationenaustauscher wird nicht

nur eine Gelmatrix verwendet, die eine hohe Beladungskapazität besitzt, robust in der Handhabung ist und ein scharfes Elutionsprofil zeigt, sondern die sich auch im industriellen Maßstab ökonomisch einsetzen läßt. Damit wird das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere für die Gewinnung von gereinigtem Faktor VIII/vWF-Komplex im großtechnischen Ansatz interessant.

Zur Durchführung des Verfahrens kann jeder bekannte Kationenaustauscher eingesetzt werden, wobei Kationenaustauscher mit einem Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen konjugierten Träger bevorzugt sind. Als gut geeignet haben sich zum Beispiel SP-Sepharose® Fast Flow und CM-Sepharose® Fast Flow (Pharmacia), Fractogel® EMD-SO3 und Fractogel® EMD COOH (Merck), Poros® 10 SP und Poros® 10 S (Perseptive Biosystems) und Toyopearl™ SP 550 C und Toyopearl™ CM-650 (M) (TosoHaas) erwiesen.

Als besonders günstig für die Gewinnung von gereinigtem vWF hat sich ein großporiges Gel mit Tentakelstruktur vom Typ Fractogel® EMD-SO3 und Fractogel® EMD COOH (Merck) erwiesen.

Die Adsorption des Faktor VIII/vWF-Komplexes an den Kationenaustauscher erfolgt vorzugsweise bei einer Salzkonzentration im Puffer von ≤ 250 mM. Bevorzugte Adsorptionspuffer weisen daher eine Salzkonzentration von 50 bis 250 mM, insbesondere im Bereich von 150 bis 250 mM (z.B. 150 mM) auf. Durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration im Puffer kann selektiv Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM, vorzugsweise ≥ 350 mM eluiert werden. Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere und proteolytische vWF-Abbauprodukte, die in der Proteinlösung enthalten sind und die eine geringe spezifische Aktivität in bezug auf die vWF-Aktivität, insbesondere auf die Ristocetin-Kofaktor-Aktivität, die Kollagenbindungsaktivität und die spezifische Plättchenagglutinationsaktivität aufweisen, sowie freier Faktor VIII:C werden bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM, vorzugsweise bei 300 mM vom Kationenaustauscher eluiert und gegebenenfalls gewonnen. Diese Fraktion kann zur weiteren Reinigung beispielsweise von Faktor VIII:C, der insbesondere frei ist von plätt-

chenagglutinierender vWF-Aktivität, eingesetzt werden.

Die Adsorption und Desorption des Faktor VIII/vWF kann in einem Puffer, enthaltend als Salz ein ein- oder zweiwertiges Metallion, erfolgen, wobei als Salz vorzugsweise NaCl verwendet wird.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird als Puffersystem zur Elution der an den Kationenaustauscher gebundenen Proteine eine Pufferlösung bestehend aus Puffersubstanzen, insbesondere Glycin, Phosphatpuffer oder Citratpuffer, und Salz verwendet.

Der Elutionspuffer kann einen pH-Wert im Bereich zwischen 4,5 bis 8,5, vorzugsweise zwischen $\geq 7,0$ und $\leq 8,5$ aufweisen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann als Batch-Verfahren oder als Säulenchromatographie durchgeführt werden.

Die optimalen Parameter wie Salzkonzentration, pH-Wert und Temperatur zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind jedoch jeweils abhängig vom verwendeten Kationenaustauschermaterial. Es liegt jedoch im allgemeinen Wissen eines Fachmannes, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung offenbarten Bedingungen zur Durchführung des Verfahrens für den jeweilig eingesetzten Kationenaustauschertyp zu optimieren.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird insbesondere ein Faktor VIII/vWF-Komplex gewonnen und angereichert, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält.

Die gewonnene Faktor VIII/vWF-Komplex-Fraktion ist im wesentlichen frei von niedermolekularen vWF-Multimeren, vWF-Fragmenten mit geringer spezifischer Aktivität und kontaminierenden Nukleinsäuren.

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von gereinigtem Faktor VIII/vWF-Komplex mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann jede Faktor VIII-Komplex-haltige Lösung eingesetzt werden. Ausgangsmaterialien sind insbesondere biologische Materialien, wie Plasma, eine Plasmafraktion, Kryopräzipitat, oder ein Überstand oder

ein Extrakt einer rekombinanten Zellkultur.

Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Lösungen können jedoch auch angereicherte Proteinlösungen sein, die durch einen vorangegangenen Schritt, etwa über Gelfiltration, Anionenaustauscherchromatographie, Affinitätschromatographie oder einer Kombination davon, vorgereinigt oder angereichert sind.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als Ausgangslösung eine über einen Anionenaustauscher angereicherte Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Fraktion eingesetzt. Bei der anschließenden Kationenaustauscherchromatographie erfolgt dann eine Reinigung und Trennung von Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend hochmolekulare bzw. niedermolekulare vWF-Multimere. Es sind jedoch auch andere Kombinationen, wie etwa Affinitäts-/Kationenaustauscher-Chromatographie, Anionenaustauscher-/Affinitäts-/Kationenaustauscherchromatographie möglich, um eine Anreicherung und selektive Gewinnung von Faktor VIII/vWF mit verbesserter spezifischer Aktivität und Stabilität zu erreichen.

Mit dem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren wird Faktor VIII/vWF mit verbesserter spezifischer Aktivität aus einem unreinen Faktor VIII/vWF-haltigen Material vielfach angereichert.

Da prinzipiell jedes biologische Material mit infektiösen Keimen kontaminiert sein kann, wird zur Herstellung eines virussicheren Präparates die gewonnene Faktor VIII/vWF-haltige Fraktion zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt. Dazu können alle aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren, wie chemisch/physikalische Methoden, Inaktivierung durch Kombination einer photoaktiven Substanz und Licht oder Abreicherung durch Filtration eingesetzt werden. Zur Inaktivierung von Viren eignet sich insbesondere eine Hitzebehandlung in Lösung bzw. in festem Zustand, welche sowohl lipidumhüllte als auch nicht-lipidumhüllte Viren verlässlich inaktivieren kann. Die Virusabreicherung erfolgt vorzugsweise durch eine Filtration über Nanofilter.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung gereinigten Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie zur Verfügung. Faktor VIII/vWF mit erhöhter spezifischer vWF-Aktivität von vorzugsweise mindestens 66 U/mg Protein und erhöhter spezifischer Faktor VIII-Aktivität von vorzugsweise mindestens 500 U/mg Protein wird ausgehend von einem Ausgangsmaterial enthaltend u.a. Faktor VIII/vWF mit geringer Reinheit und niedriger spezifischer Aktivität angereichert und Begleitproteine, insbesondere nicht oder schwach gebundener und damit freier Faktor VIII bzw. Faktor VIII-Komplex mit geringer vWF-Aktivität, werden selektiv abgetrennt. Dadurch wird ein Faktor VIII/vWF-Komplex gewonnen, der hochmolekulare vWF-Multimere enthält und im wesentlichen frei ist von Faktor VIII-Komplex mit niedermolekularen vWF-Multimeren, vWF-Abbauprodukten, nicht-komplexiertem Faktor VIII und möglicherweise Faktor VIIId. Der erfindungsgemäße Faktor VIII/vWF-Komplex weist aufgrund der selektiven Anreicherung von hochmolekularen vWF-Multimeren eine verbesserte Plättchenagglutinationsaktivität und eine erhöhte Stabilität auf.

Gemäß einem weiteren Aspekt wird ein Faktor VIII:C im wesentlichen frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung, durch Kationenaustauschchromatographie und stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 200 mM und ≤ 300 mM zur Verfügung gestellt.

Gemäß einem weiteren Aspekt wird eine gereinigte Präparation enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, oder Faktor VIII:C, im wesentlichen frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität, zur Verfügung gestellt.

Bei Gewinnung und Herstellung der erfindungsgemäßen Präparation mit einem Ausgangsmaterial plasmatischen oder rekombinanten Ursprungs wird, wie oben beschrieben, zur Entfernung von infektiösen Partikeln gegebenenfalls ein Virusabreicherungs/oder Inaktivierungsverfahren durchgeführt, wobei eine Virusinaktivierung

und/oder Virusabreicherung prinzipiell vor oder nach jedem Reinigungsschritt ausgehend vom Ausgangsmaterial bis zur hergestellten pharmazeutischen Zubereitung erfolgen kann. Damit ist die erfindungsgemäße Präparation in jedem Fall virussicher und frei von infektiösem Material.

Ein weiteres Kriterium für die Reinheit und geringe Infektiosität eines Produktes ist auch die Abwesenheit von kontaminierenden Nukleinsäuren. Die erfindungsgemäße Präparation ist daher im wesentlichen frei von Nukleinsäuren. "Im wesentlichen" bedeutet hier, daß der Gehalt an Nukleinsäure $\leq 0,7$ bezogen auf das Verhältnis 260/280 nm ist. Die Nukleinsäure kann jedoch auch gemäß einem Verfahren, wie es beispielsweise in der EP 0 714 987 und der EP 0 714 988 beschrieben wird, quantifiziert werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt liegt die erfindungsgemäße Präparation in einer lagerstabilen Form vor. Die Präparation enthaltend gereinigten Faktor VIII/vWF mit verbesserter spezifischer vWF-Aktivität kann als fertige Lösung, Lyophilisat oder tiefgefroren bereitgestellt werden. Aufgrund ihrer Reinheit ist die Präparation besonders stabil. Es hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäße Präparation bei -20°C für mindestens 6 Monate, bei 4°C in Lösung für mindestens 4 Wochen und als Lyophilisat für mindestens 1 Jahr stabil ist. Es zeigte sich, daß innerhalb des jeweiligen Zeitraumes die Faktor VIII/vWF-Aktivität um maximal 10% reduziert wird und das Multimermuster der vWF-Multimere keine wesentliche Änderung zeigt.

Die Formulierung der erfindungsgemäßen Präparation kann in an sich bekannter und üblicher Weise erfolgen. Der gereinigte Faktor VIII/vWF, enthalten in der erfindungsgemäßen Präparation, wird mit einem Puffer enthaltend Salze, wie NaCl, Trinatriumcitratdihydrat und/oder CaCl_2 , und Aminosäuren, wie Glycin und Lysin, bei einem pH im Bereich von 6 bis 8 gemischt und als pharmazeutisches Präparat formuliert.

Die Präparation kann zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit Hämophilie, phänotypischer Hämophilie und vWD verwendet werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparation aus Plasma oder einer Plasmafunktion, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß Plasma oder eine Plasmafraktion mit einem Kationenaustauscher kontaktiert wird, wobei der Faktor VIII/vWF-Komplex adsorbiert wird, der mit Faktor VIII/vWF-Komplex beladene Kationenaustauscher gegebenenfalls gewaschen wird, anschließend der Faktor VIII/vWF-Komplex eluiert wird, wobei ein Eluat mit einer bezüglich dem Faktor VIII/vWF-Komplex mindestens 300-fachen Reinheit und einer Ausbeute an Faktor VIII/vWF-Komplex von mindestens 50% gegenüber Plasma erhalten wird, und schließlich das erhaltene Eluat zu einer Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparation aufgearbeitet wird.

Überraschenderweise wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellt, daß der Faktor VIII/vWF-Komplex mit einer Kationenaustauscherchromatographie ausgehend von Plasma oder einer Plasmafraktion in hoher Reinheit und gleichzeitig mit hoher Ausbeute zur Verfügung gestellt werden kann.

Als Plasmafraktion wird beispielsweise ein Kryopräzipitat, eventuell nach vorheriger Adsorptionsbehandlung zur Entfernung von Prothrombin-Komplex, oder eine Cohn-Fraktion eingesetzt.

Das Verfahren eignet sich hervorragend zur Reinigung des Faktor VIII-Komplex aus einer Plasmafraktion im industriellen Maßstab, da aufgrund der effektiven Reinigung eine Vielzahl von weiteren Reinigungsschritten, z.B. weiteren chromatographischen Reinigungsschritten, nicht erforderlich ist. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß der Faktor VIII-Komplex durch die einfache Kationenaustauscherchromatographie mit einer mindestens 300-fachen Reinheit gegenüber Plasma, vorzugsweise mindestens 400-fachen Reinheit, erhalten werden kann, mit einer gleichzeitig hohen Ausbeute von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60%, bezogen auf Plasma. Es ist daher bevorzugt, das Reinigungsverfahren derart zu gestalten, daß nur eine einzige chromatographische Reinigung vorgenommen wird, nämlich die an dem Kationenaustauscher. Diese chromatographische Reinigung wird üblicherweise als terminaler Reinigungsschritt vorgenommen, bevor der Faktor

VIII-Komplex zu einer pharmazeutischen Präparation formuliert wird.

Üblicherweise wird das Ausgangsmaterial in einem kalziumhaltigen Puffer auf den Kationenaustauscher aufgetragen. Unmittelbar vor dem Auftragen bietet sich auch eine Maßnahme zur Inaktivierung von potentiell vorhandenen Viren an, wie humanpathogene Viren, die durch Blut übertragbar sind. Dabei ist eine Behandlung mit einem viriziden Detergens bzw. einem organischen Lösungsmittel und/oder Detergens bevorzugt. Eine Behandlung mit Triton oder Tween in Gegenwart von TNBP (Tri(n-butyl)phosphat) wird beispielsweise gemäß der EP 0 131 740 durchgeführt. Durch die anschließende Kationenaustauscherchromatographie wird das viruzide Mittel effektiv entfernt. Falls der adsorbierte Komplex gewaschen wird, wird diese Waschung bevorzugterweise mit einem Waschpuffer durchgeführt, dessen Ionenstärke über der des Adsorptionspuffers liegt, beispielsweise 10 bis 30% höher. Zur Elution des Faktor VIII/vWF-Komplexes wird vorzugsweise die Ionenstärke weiter erhöht. Die Elution des Faktor VIII/vWF-Komplexes wird durch die Erhöhung der Ionenstärke erreicht, welche vorzugsweise um mindestens 50%, am meisten bevorzugt um mindestens 100%, gegenüber der Ionenstärke der Ausgangslösung erhöht ist. Der Elutionspuffer enthält vorzugsweise Natriumchlorid. Zur Formulierung einer pharmazeutischen Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparation wird üblicherweise diafiltriert und sterilfiltriert, sowie gegebenenfalls lyophilisiert.

Die Aktivität des Faktor VIII bzw. vWF wird durch die Kationenaustauscherchromatographie kaum beeinträchtigt. Es hat sich herausgestellt, daß die Ausbeute des Faktor VIII-Komplexes von mehr als 90% bezogen auf die Aktivität vor der Chromatographie gewährleistet ist. Deshalb kann auch während der chromatographischen Reinigung auf übliche Stabilisatoren des Faktor VIII, wie z.B. Antithrombin III und/oder Heparin verzichtet werden.

Im Gegensatz zu im Stand der Technik bekannten Verfahren, in welchen die Kationenaustauscherchromatographie stets nur für bereits aufgereinigte Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparationen in Erwägung gezogen worden ist (vgl. EP 0 600 480-A2), hat sich

erfindungsgemäß gezeigt, daß sich die Kationenaustauscherchromatographie ausgezeichnet zur direkten Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex aus Plasma oder einer (rohen) Plasmafraktion eignet. Mit einem derartigen Verfahren ist es nicht einmal notwendig, zur Herstellung einer Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparation weitere chromatographische Verfahren vorzusehen, da die Reinheit, die durch die Kationenaustauscherchromatographie ausgehend von Plasma oder einer Plasmafraktion erzielt wird, bereits den Anforderungen an kommerzielle Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparate genügt.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnungsfiguren näher erläutert, wobei sie jedoch nicht auf diese Ausführungsbeispiele beschränkt ist.

Es zeigen:

Figur 1: vWF-Multimer-Analyse von Faktor VIII/vWF-Komplex aus Kryopräzipitat vor und nach Reinigung mit Kationenaustauscher

Figur 2: vWF-Multimer-Analyse von Faktor VIII/vWF-Komplex aus Kryopräzipitat vor und nach Reinigung mittels kombinierter Anionen/Kationenaustauscherchromatographie

Beispiel 1 beschreibt die Reinigung von plasmatischem Faktor VIII/vWF-Komplex durch Kationenaustauscherchromatographie und stufenweiser Elution; Beispiel 2 beschreibt die Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex durch Kombination von Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie und stufenweiser Elution vom Kationenaustauscher; Beispiel 3 beschreibt die Reinigung von rvWF/rFaktor VIII-Komplex mittels Kationenaustauscher; Beispiel 4 beschreibt die Isolierung des Faktor VIII/vWF-Komplexes über Kationenaustausch.

B e i s p i e l 1:

Reinigung von plasmatischem FVIII-Komplex durch Kationenaustauscherchromatographie

Kryopräzipitat aus humanem Plasma wurde in Natrium-Acetat-Puf-

fer, pH 7, aufgelöst und es wurden 20 Einheiten Heparin pro ml Lösung zugegeben. Pro 1 g Kryopräzipitat wurden 0,25 ml 2% $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension zugegeben, und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 10000 RPM zentrifugiert, um ein trübungsfreies Kryopräzipitat zu erhalten.

Eine Chromatographiesäule wurde mit Fractogel® EMD-SO3 gefüllt und mit Puffer (30 mM Glycin-NaCl-Puffer) gespült. Anschließend wurde aufgelöstes Kryopräzipitat durch die Kationenaustauschersäule filtriert und im Durchfluß wurden solche Proteine erhalten, die nicht an den Austauscher binden (Fraktion 1). Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit 0,3 M NaCl in Puffer entfernt (Fraktion 2). Anschließend wurde FVIII/vWF-Komplex von der Austauschersäule durch Elution mit 0,4 M bzw. 0,5 M NaCl eluiert (Fraktion 3 bzw. Fraktion 4).

Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, daß sowohl vWF als auch FVIII durch den Kationenaustauscher gebunden wurden. Durch Spülen der Kationenaustauschersäule mit 0,3 M NaCl (Fraktion 2) wurden kein vWF und nur 10 % der FVIII-Aktivität erhalten. Durch diese Elutionsstufe wurde der FVIII, der nicht als Komplex mit funktionell aktivem vWF vorlag, abgetrennt. Durch anschließende Desorption mit 0,4 M NaCl (Fraktion 3) wurde FVIII/vWF-Komplex erhalten, der etwa 20 % des funktionell aktiven vWF und etwa 30 % der Gesamtmenge an FVIII enthielt. Der restliche FVIII-Komplex wurde anschließend mit 500 mM NaCl vom Kationenaustauscher eluiert (Fraktion 4). Fraktion 4 enthielt Faktor VIII/vWF-Komplex, der 80 % der vWF-Aktivität und 50 % der FVIII-Aktivität ausgehend vom Kryopräzipitat beinhaltet. Durch die Kationenaustauscherchromatographie kam es zu einer 20-fachen Reinigung von FVIII (spezifische Aktivität: 12 IU FVIII:C/mg Protein) gegenüber Kryopräzipitat bzw. zu einer 350-fachen Aufreinigung von FVIII bezogen auf Plasma (Fraktion 4). Aus der Fraktion 3 kann FVIII gewonnen werden.

Figur 1 zeigt die vWF-Multimer-Analyse von Faktor VIII/vWF-Komplex vor und nach Reinigung mit Kationenaustauscher, wobei Spur A das vWF-Multimermuster des Kryopräzipitats, Spur B des 300 mM NaCl-Eluats (Fraktion 2, Tabelle 1), Spur C des 400 mM

NaCl-Eluats (Fraktion 3, Tabelle 1) und Spur D des 500 mM Eluats (Fraktion 4, Tabelle 1) darstellt. Aus Figur 1 ist ersichtlich, daß durch die Kationenaustauscherchromatographie ein Faktor VIII/vWF-Komplex mit hochmolekularen vWF-Multimerstruktur erhalten wird. Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere wird entweder nicht an den Kationenaustauscher gebunden (Fraktion 1) oder bei der Elution mit 0,3 M NaCl abgetrennt (Fraktion 2).

Tabelle 1: Reinigung von FVIII/vWF-Komplex aus Kryopräzipitat mittels Kationenaustauscherchromatographie

Probe	vWF:Risto-CoF-Aktivität (U/ml)	FVIII:C-Aktivität (U/ml)
Kryopräzipitat	2,2	2,4
Fraktion 1 (Nicht gebunden)	0	0
Fraktion 2 (Eluat 300 mM NaCl)	0	0,1
Fraktion 3 (Eluat 400 mM NaCl)	1,8	3,6
Fraktion 4 (Eluat 500 mM NaCl)	1,8	1,5

B e i s p i e l 2 :

Reinigung von plasmatischem FVIII/vWF-Komplex durch Kombination von Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie

Kryopräzipitat aus humanem Plasma wurde in einem Puffer aus 7 mM Tris, 100 mM Na-Acetat, 100 mM Lysin, 120 mM NaCl bei pH 6,7 aufgelöst. Zur Vorbehandlung wurde $\text{Al}(\text{OH})_3$ eingerührt. Anschließend wurde der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt.

Auf diese Weise vorbehandeltes Kryopräzipitat wurde auf eine Säule Fractogel® EMD-TMAE aufgetragen. Nicht gebundene Proteine wurde durch Spülen der Säule mit Lösungspuffer erhalten (Frak-

tion 1). Diese Fraktion 1 enthielt 60 % der vWF-Aktivität, jedoch nur 10 % der FVIII-Aktivität. Durch Elution der Säule mit 400 mM NaCl (Fraktion 2) wurde anschließend FVIII/vWF-Komplex erhalten. Fraktion 2 enthielt die restliche vWF-Aktivität und 70 % der FVIII-Aktivität ausgehend vom Kryopräzipitat.

Tabelle 2: Reinigung von FVIII-vWF-Komplex durch Kombination von Anionen- und Kationenaustauscherchromatographie

Probe	vWF:RistoCoF-Aktivität (U/ml)	FVIII:C Aktivität (U/ml)
Kryopräzipitat	12,5	12,2
Fraktion 1 (nicht gebunden)	3,5	0,7
Fraktion 2 (Eluat 400 mM NaCl)	2,5	14,5

Der FVIII/vWF-Komplex der Fraktion 2 wurde mit 20 mM Glycin/NaCl-Puffer 4-fach verdünnt, und anschließend auf eine Kationenaustauschersäule Fractogel® EMD-SO3 aufgetragen. Nicht-bindende Proteine wurden in der Fraktion 1 erhalten. Schwach gebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit 200 mM NaCl entfernt (Fraktion 2). Anschließend wurde stufenweise mit 400 mM NaCl (Fraktion 3) und 500 mM NaCl (Fraktion 4) eluiert. In den Fraktionen 3 und 4 wurden jeweils 45 % der vWF-Aktivität und 55 % bzw. 40 % der FVIII-Aktivitäten gefunden.

Tabelle 3: Reinigung von FVIII/vWF-Komplex durch Kombination von Anionen- und Kationenaustauscherchromatographie

Probe	vWF:RistoCoF Aktivität (U/ml)	FVIII:C Aktivität (U/ml)
Ausgang	0,63	3,6
Fraktion 1 (nicht gebunden)	0	0
Fraktion 2 (Eluat 200 mM NaCl)	0	0
Fraktion 3 (Eluat 400 mM NaCl)	0,3	2,26
Fraktion 4 (Eluat 500 mM NaCl)	0,25	1,43

Aus der Tabelle 3 ist ersichtlich, daß sowohl vWF als auch FVIII durch den Kationenaustauscher gebunden werden. Durch Spülen der Kationenaustauschersäule mit 0,2 M NaCl (Fraktion 2) wurde kein aktiver vWF und kein FVIII gefunden. Der FVIII/vWF-Komplex wurde anschließend in den Fraktionen 3 und 4 eluiert.

Während die spezifische Aktivität des FVIII:C im Kryopräzipitat 0,59 U/mg Protein betrug, beträgt die spezifische Aktivität des FVIII:C in den Fraktionen 3 und 4 500 U/mg Protein bzw. 477 U/mg Protein. Die spezifische Aktivität des vWF stieg ausgehend von Kryopräzipitat von 0,6 U/mg Protein auf 66 U/mg Protein und 83 U/mg Protein in den Fraktionen 3 und 4.

Figur 2 zeigt die vWF-Multimer-Analyse von Faktor VIII/vWF-Komplex vor und nach Reinigung mit kombinierter Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie, wobei die Spuren a bis c die Chromatographie am Anionenaustauscher und die Spuren d bis g am Kationenaustauscher zeigen. Fig. 2 zeigt in Spur a das vWF-Multimermuster des Kryopräzipitats, Spur b des Durchlaufs (Fraktion 1, Tabelle 2), Spur c des 400 mM NaCl-Eluats (Fraktion 2, Tabelle 2), Spur d des 400 mM NaCl-Eluats (Fraktion 2, Tabelle 2) vor Kationenaustauscher, Spur e des 200 mM NaCl-Eluats (Fraktion 2, Tabelle 3), Spur f des 400 mM NaCl-Eluats (Fraktion 3, Tabelle 3) und Spur g des 500 mM NaCl-Eluats (Fraktion 4, Tabelle 3).

B e i s p i e l 3 :

Reinigung eines r-vWF/r-FVIII-Komplexes mittels Kationenaustauscherchromatographie (Derzeit nach Ansicht der Anmelderin der beste Weg zur Ausführung der Erfindung)

1000 ml eines Zellkulturüberstandes, enthaltend rekombinanten rFVIII/rvWF-Komplex, wurden auf eine Säule, gefüllt mit 20 ml Fractogel® TSK-SO3, aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit Puffer, pH 7,4, mit 250 mM NaCl, wurde der gebundene rFVIII/rvWF-Komplex mit einem Puffer, pH 7,4, mit 600 mM NaCl eluiert. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dieses Säulenlaufes dargestellt.

Tabelle 4: Reinigung von rekombinanten rFVIII/rvWF-Komplex mittels Kationenaustauscherchromatographie

Probe	FVIII:C Aktivität (U/ml)	vWF:RistoCoF-Aktivität (U/ml)
Ausgang	2,3	0,1
Durchfluß	0,1	0
250 mM NaCl-Eluat	0,2	0
600 mM NaCl-Eluat	85	4,4

Das Beispiel zeigt, daß ein Komplex bestehend aus rekombinantem FVIII und rekombinantem vWF (der normalerweise während der Fermentation von rekombinantem FVIII anfällt) an einen Kationenaustauscher bindet und selektiv durch Erhöhung der Salzkonzentration, von Begleitproteinen getrennt, eluiert werden kann.

In dem Beispiel wurde ein rFVIII/rvWF-Komplex mit einer spezifischen FVIII-Aktivität von 130 U/mg Protein in einer Ausbeute von 75% erhalten. Dies entspricht einem Reinigungsfaktor von 28 für diesen Schritt. Die spezifische Aktivität des r-vWF hängt stark von der Qualität des exprimierten r-vWF ab. In diesem Fall lag sie bei 7 U/mg im Eluat, was einem Reinigungsfaktor von 35 entspricht.

Durch Variation des rFVIII/rvWF-Verhältnisses im Ausgang, oder

durch Anschließen eines weiteren chromatographischen Schrittes, kann die spezifische Aktivität des FVIII:C noch weiter verbessert werden.

B e i s p i e l 4 :

Isolierung des FVIII/vWF-Komplexes über Kationenaustausch

B e i s p i e l 4A:

210 g Kryopräzipitat werden in 950 ml CaCl_2 -heparinhaltigem Citratpuffer gelöst und auf pH 6,0 gestellt. Unlösliche Anteile, hauptsächlich Fibrinogen, wurden abtrennt. Zur Inaktivierung von eventuell vorhandenen pathogenen Viren wurde die klare Lösung mit 1 % Triton X100 und 0,3 % TNBP (Tri(n-butyl)phosphat) behandelt. 100 ml Fractogel EMD- SO_3^- -650 (M) der Fa. Merck, Darmstadt (DE), wurden zur Adsorption des virusinaktivierten FVIII herangezogen, das zuvor bei pH 6,0 in einer acetatgepufferten NaCl-Lösung mit einer Leitfähigkeit von 10 mS/cm äquilibriert wurde. Der FVIII wurde durch Erhöhung der Ionenstärke auf 500 mM NaCl vom Gel abeluiert; vorher wurde eine Waschung mit 500 ml 150 mM NaCl-Lösung durchgeführt.

B e i s p i e l 4B:

Statt Fractogel EMD- SO_3^- wurde in diesem Beispiel Toyopearl SP-550C verwendet.

E r g e b n i s s e :

	Ausbeute/Plasma		Reinheitsgrad gegenüber Plasma
	FVIIIc	FvWF	
Beispiel 4A	62 %	68 %	450 X
Beispiel 4B	56 %	62 %	370 X

FVIIIc und FvWF sind in derselben Fraktion gewonnen worden.

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Kationenaustauscher gebunden und durch stufenweise Elution Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, gewonnen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex bei einer Salzkonzentration von ≤ 250 mM an einen Kationenaustauscher gebunden wird und Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere, Faktor VIII frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität und Faktor VIII:C bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM eluiert und gewonnen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, durch stufenweise Fraktionierung bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM, vorzugsweise ≥ 350 mM gewonnen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Fraktion gewonnen wird, die insbesondere frei ist von niedermolekularen vWF-Multimeren und vWF-Abbauprodukten, nicht-komplexierten, oder schwach an vWF gebundenem Faktor VIII und kontaminierenden Nukleinsäuren.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution der Polypeptide vom Kationenaustauscher in einem Puffersystem mit einem pH-Wert im Bereich zwischen 4,5 und 8,5, vorzugsweise $\geq 7,1$ und $\leq 8,5$ erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Kationenaustauscher ein Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen konjugierte Träger ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend insbeson-

dere hochmolekulare vWF-Multimere gewonnen wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus Plasma, einer Plasmafraktion, Kryopräzipitat, dem zellfreien Überstand oder Extrakt einer rekombinanten Zellkultur, oder einer angereicherten Proteinfraction gewonnen wird.

9. Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie.

10. Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß er insbesondere frei ist von niedermolekularen vWF-Multimeren, inaktiven vWF-Abbauprodukten und Faktor VIII frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität und von Faktor VIIIA-Aktivität.

11. Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß er eine spezifische vWF-Aktivität von mindestens 66 U/mg Protein und eine spezifische Faktor VIII-Aktivität von mindestens 500 U/mg Protein aufweist.

12. Faktor VIII:C im wesentlichen frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie und stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 200 mM und ≤ 300 mM.

13. Präparation enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex oder Faktor VIII:C gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie virussicher und frei von infektiösem Material ist.

14. Präparation nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer lagerstabilen Form vorliegt.

15. Präparation nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch ge-

kennzeichnet, daß sie als pharmazeutisches Präparat formuliert ist.

16. Verwendung einer Präparation nach einem der Ansprüche 13 bis 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit Hämophilie A, phänotypischer Hämophilie und vWD.

17. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß von Plasma oder einer Plasmafraktion ausgegangen wird, und der Faktor VIII/vWF-Komplex in einer mindestens 300-fachen Reinheit und einer Ausbeute von mindestens 50% gegenüber Plasma erhalten wird.

18. Verfahren zur Herstellung einer Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparation aus Plasma oder einer Plasmafraktion, dadurch gekennzeichnet, daß Plasma oder eine Plasmafraktion mit einem Kationenaustauscher kontaktiert wird, wobei der Faktor VIII/vWF-Komplex adsorbiert wird, der mit Faktor VIII/vWF-Komplex beladene Kationenaustauscher gegebenenfalls gewaschen wird, anschließend der Faktor VIII/vWF-Komplex eluiert wird, wobei ein Eluat mit einer bezüglich dem Faktor VIII/vWF-Komplex mindestens 300-fachen Reinheit und einer Ausbeute an Faktor VIII/vWF-Komplex von mindestens 50% gegenüber Plasma erhalten wird, und schließlich das erhaltene Eluat zu einer Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparation aufgearbeitet wird.

19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Eluieren des Faktor VIII/vWF-Komplexes vom Kationenaustauscher derart durchgeführt wird, daß das erhaltene Eluat Faktor VIII in einer Ausbeute enthält, die mindestens 90% der Faktor VIII-Aktivität vor der Adsorption an den Kationenaustauscher beträgt.

20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß beim Aufarbeiten des Faktor VIII/vWF-Präparats kein weiterer chromatographischer Reinigungsschritt vorgenommen wird.

Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex
mittels Kationenaustauscherchromatographie

Z u s a m m e n f a s s u n g :

Beschrieben wird ein Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex, welches sich dadurch auszeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Kationenaustauscher gebunden und durch stufenweise Elution Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, gewonnen wird, sowie ein Faktor VIII/vWF-Komplex, erhältlich mittels Kationenaustauscherchromatographie.

Fig. 1.

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/755, A61K 38/37	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/38220 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 3. September 1998 (03.09.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT98/00043 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Februar 1998 (27.02.98) (30) Prioritätsdaten: A 338/97 27. Februar 1997 (27.02.97) AT (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MITTERER, Artur [AT/AT]; A-2304 Mannsdorf 116 (AT). FISCHER, Bern- hard [DE/AT]; Jägerhausgasse 14/11, A-1120 Wien (AT). SCHÖNBERGER, Öyving, L. [DE/AT]; Schopenhauer- strasse 52/7, A-1180 Wien (AT). THOMAS-URBAN, Kathrin [AU/DE]; Kartäuserstrasse 149, D-79104 Freiburg (DE). DORNER, Friedrich [AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT). EIBL, Johann [AT/AT]; Gus- tav-Tschermakgasse 2, A-1180 Wien (AT). (74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CZ, HU, IL, JP, MX, NO, PL, RU, SI, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen. changed new address	

(54) Title: METHOD FOR PURIFYING FACTOR VIII/VWF COMPLEX BY CATION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR REINIGUNG VON FAKTOR VIII/VWF-KOMPLEX MITTELS KATIONENAUSTAUSCHER-
CHROMATOGRAPHIE

(57) Abstract

The invention relates to a method for obtaining factor VIII/vWF complex, characterized in that factor VIII/vWF complex from a protein solution is bonded with a cation-exchanger and factor VIII/vWF complex especially containing vWF multimers of high molecular weight is obtained by gradual elution. The invention also relates to a factor VIII/vWF complex which can be obtained by cation-exchange chromatography.

(57) Zusammenfassung

Beschrieben wird ein Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex, welches sich dadurch auszeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Kationenaustauscher gebunden und durch stufenweise Elution Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, gewonnen wird, sowie ein Faktor VIII/vWF-Komplex, erhältlich mittels Kationenaustauscherchromatographie.

Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex
mittels Kationenaustauscherchromatographie

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex aus einem biologischen Ausgangsmaterial mittels Kationenaustauscherchromatographie und stufenweiser Elution, sowie gereinigten Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekularen vWF-Multimeren, enthält.

Im Plasma zirkuliert der von Willebrand-Faktor in einer Konzentration von 5 bis 10 mg/l und zum größten Teil in Form eines nicht-kovalent gebundenen Komplexes mit Faktor VIII. Im Kryopräzipitat ist Faktor VIII/vWF-Komplex stark angereichert und kann daraus oder aus Plasma oder Plasmafraktionen mit bekannten Fraktionierungsverfahren isoliert werden.

Bei der Hämophilie ist die Blutgerinnung durch Mangel an bestimmten plasmatischen Blutgerinnungsfaktoren gestört. Bei der Hämophilie A beruht die Blutungsneigung auf einem Mangel an Faktor VIII bzw. vWF (phänotypische Hämophilie). Die Behandlung der Hämophilie A erfolgt in erster Linie durch Ersatz des fehlenden Gerinnungsfaktors durch Faktorenkonzentrate z.B. durch Infusion von Faktor VIII oder Faktor VIII/vWF-Komplex.

Für den Einsatz zur Therapie von Patienten mit Hämophilie A, aber auch von von Willebrand-Syndrom ist ein gereinigter Faktor VIII, komplexiert mit vWF, wünschenswert (Berntorp, 1994, Haemostasis 24:289-297). Insbesondere wird immer wieder betont, daß in Präparaten ohne oder nur einem geringen Gehalt an vWF, eine verlängerte Blutungszeit und eine geringe Faktor VIII:C-Halbwertszeit in vivo zu beobachten ist. Eine Normalisierung von vWF in vivo ist wichtig, um eine Konzentration von Faktor VIII im Plasma sowohl durch Reduktion der Faktor VIII-Eliminierungsrate als auch durch Unterstützung der Freisetzung von endogenem Faktor VIII, aufrecht zu erhalten (Lethagen et al., 1992, Ann. Hematol. 65: 253-259).



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

1

2

Die DE 3 504 385 beschreibt die Durchführung einer Ionenaustauscherchromatographie zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex, wobei der Faktor VIII-Komplex über Sulfatgruppen gebunden und mit Citratpuffer, Calciumchlorid und NaCl-Gradient eluiert wird. Der Faktor VIII/vWF-Komplex wird dabei mit einer Konzentration von 0,5 M NaCl vom Träger eluiert.

Die EP 0 416 983 beschreibt die Gewinnung des Faktor VIII/vWF-Komplexes aus menschlichem Plasma durch eine Kombination aus Bariumchlorid- oder Aluminiumhydroxid-Fällung und Anionen-Austauscherchromatographie an DEAE-Fractogel.

Harrison et al. (Thrombosis Res., 1988; 50, 295-304) beschreibt die Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex durch Chromatographie an Dextran-Sulfat-Sepharose.

Die EP 0 600 480 beschreibt ein Aufreinigungsverfahren für Faktor VIII/vWF-Komplex aus Vollplasma mittels kombinierter Anionenaustauscher/Kationenaustauscher-Chromatographie. Die Elution des an den Kationenaustauscher adsorbierten FVIII/vWF-Komplexes erfolgt dabei unter Verwendung eines Ca-haltigen Puffers mit 0,3 M NaCl in einem pH-Bereich zwischen 6,6 bis 7,0.

Die WO 96/10584 beschreibt ein Verfahren zur Gewinnung von hochreinem rekombinantem vWF mittels kombinierter Anionenaustauscher/Heparin-Affinitätschromatographie und die EP 0 705 846 die Trennung zwischen hoch- und niedermolekularen Fraktionen von rekombinantem vWF mittels Heparin-Affinitätschromatographie.

Die im Stand der Technik beschriebenen Faktor VIII-Präparate enthalten zwar zum größten Teil das gesamte vWF-Multimerpattern, jedoch variieren sie im Anteil an hochmolekularen vWF (HMW-vWF) und niedermolekularen vWF (LMW-vWF) und weisen auch sogenannte Triplett-Strukturen auf, die auf einen proteolytischen Abbau, insbesondere von HMW-vWF, hinweisen. Die Stabilität dieser Präparate ist dadurch oft begrenzt.

Es wird immer wieder betont, daß Faktor VIII/vWF-Präparationen, enthaltend im wesentlichen HMW-vWF, möglicherweise einen guten



1. 1. 1.

1. 1. 1.

Einfluß auf die Blutungszeit hätten, da sie die primäre Funktion des vWF, die Plättchenagglutination, ausführen und eine höhere Affinität zu den Plättchenrezeptoren Glykoprotein IB und IIb/IIIa haben als niedermolekulare vWF-Multimere.

Es besteht ein Bedarf an einem Faktor VIII-Komplex mit einer ausreichenden spezifischen Aktivität an Faktor VIII:C- und vWF-Aktivität. Ein Problem bei der Gewinnung eines solchen Komplexes ist insbesondere die Abtrennung von Molekülen enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere und Anreicherung von Komplexen mit hoher spezifischer vWF-Aktivität.

Ziel der vorliegenden Erfindung ist es daher, einen Faktor VIII/vWF-Komplex mit einer verbesserten spezifischen Aktivität und Stabilität zur Verfügung zu stellen.

Ein weiteres Ziel ist es, ein Verfahren zur Gewinnung eines solchen Faktor VIII/vWF-Komplex zur Verfügung zu stellen. Das Verfahren sollte sowohl für die Reinigung von rekombinantem als auch plasmatischem Faktor VIII/vWF-Komplex einsetzbar sein.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß ein Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex zur Verfügung gestellt wird, bei dem Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Kationenaustauscher gebunden wird und durch stufenweise, fraktionierte Elution Faktor VIII/vWF-Komplex mit verbesserter spezifischer vWF-Aktivität gewonnen wird. Die Gewinnung und Anreicherung von Faktor VIII/vWF mit verbesserter Aktivität und Stabilität erfolgt insbesondere dadurch, daß Faktor VIII/vWF-Komplex bei einer niedrigen Salzkonzentration gebunden wird, durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration Fraktionen enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex mit niedermolekularen vWF-Multimeren, inaktiven vWF-Abbauprodukten und unspezifische Begleitproteine bei einer mittleren Salzkonzentration abgetrennt und Fraktionen enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, bei einer höheren Salzkonzentration gewonnen werden.

Faktor VIII/vWF-Komplex wird üblicherweise aufgrund seines sau-



ren isoelektrischen Punktes (IEP = 5,5 bis 6) und seiner daraus resultierenden negativen Netto-Ladung im schwach sauren bis basischen Milieu über positiv geladene Anionenaustauscher aufgereinigt. Es war daher aufgrund der bisher beschriebenen Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex mittels positiv geladener Anionenaustauscher nicht zu erwarten, daß Faktor VIII/vWF-Komplex ebenfalls bei einem pH-Wert, der oberhalb des IEP des Komplexes liegt, und niedriger Salzkonzentration an eine negativ geladene Gelmatrix eines Kationenaustauschers bindet und von dieser durch Erhöhung der Salzkonzentration selektiv eluierbar ist. Es war ebenfalls nicht zu erwarten, daß durch stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration von ungefähr zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM unspezifische Begleitproteine, inaktive vWF-Abbauprodukte, Komplexkomponenten mit geringer spezifischer Aktivität, Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere, nicht-komplexierter oder nur schwach gebundener Faktor VIII und freier Faktor VIII eluiert werden und bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM insbesondere Faktor VIII/vWF-Komplex mit hochmolekularen vWF-Multimere erhalten werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren, ausgehend von einem unreinen biologischen Material, gereinigte Fraktionen erhalten werden, die im wesentlichen frei von kontaminierenden Nukleinsäuren sind. Dadurch werden durch das Verfahren auch Nukleinsäuren aus Proteinpräparationen entfernt. Dieser Effekt kann mit herkömmlichen Verfahren mittels Anionenaustauscher nicht gezeigt werden, da Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Ladung an den Anionenaustauscher binden, sich durch Erhöhung der Salzkonzentration wieder vom Anionenaustauscher ablösen und ins Eluat gelangen.

Bei der Reinigung des Faktor VIII/vWF-Komplexes ist insbesondere zu beachten, daß, bedingt durch die Größe des vWF von 500 000 bis mehrere Millionen, nur solche Trägermaterialien gute Reinigungen und Ausbeuten liefern, die den Faktor VIII/vWF-Komplex in der Diffusion und Verteilung in den verwendeten Trägermaterialien nicht behindern. Bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahren zur Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex mit hoher spezifischer Aktivität mittels Kationenaustauscher wird nicht



nur eine Gelmatrix verwendet, die eine hohe Beladungskapazität besitzt, robust in der Handhabung ist und ein scharfes Elutionsprofil zeigt, sondern die sich auch im industriellen Maßstab ökonomisch einsetzen läßt. Damit wird das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere für die Gewinnung von gereinigtem Faktor VIII/vWF-Komplex im großtechnischen Ansatz interessant.

Zur Durchführung des Verfahrens kann jeder bekannte Kationenaustauscher eingesetzt werden, wobei Kationenaustauscher mit einem Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen konjugierten Träger bevorzugt sind. Als gut geeignet haben sich zum Beispiel SP-Sepharose® Fast Flow und CM-Sepharose® Fast Flow (Pharmacia), Fractogel® EMD-SO3 und Fractogel® EMD COOH (Merck), Poros® 10 SP und Poros® 10 S (Perseptive Biosystems) und Toyopearl™ SP 550 C und Toyopearl™ CM-650 (M) (TosoHaas) erwiesen.

Als besonders günstig für die Gewinnung von gereinigtem vWF hat sich ein großporiges Gel mit Tentakelstruktur vom Typ Fractogel® EMD-SO3 und Fractogel® EMD COOH (Merck) erwiesen.

Die Adsorption des Faktor VIII/vWF-Komplexes an den Kationenaustauscher erfolgt vorzugsweise bei einer Salzkonzentration im Puffer von ≤ 250 mM. Bevorzugte Adsorptionspuffer weisen daher eine Salzkonzentration von 50 bis 250 mM, insbesondere im Bereich von 150 bis 250 mM (z.B. 150 mM) auf. Durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration im Puffer kann selektiv Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM, vorzugsweise ≥ 350 mM eluiert werden. Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere und proteolytische vWF-Abbauprodukte, die in der Proteinlösung enthalten sind und die eine geringe spezifische Aktivität in bezug auf die vWF-Aktivität, insbesondere auf die Ristocetin-Kofaktor-Aktivität, die Kollagenbindungsaktivität und die spezifische Plättchenagglutinationsaktivität aufweisen, sowie freier Faktor VIII:C werden bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM, vorzugsweise bei 300 mM vom Kationenaustauscher eluiert und gegebenenfalls gewonnen. Diese Fraktion kann zur weiteren Reinigung beispielsweise von Faktor VIII:C, der insbesondere frei ist von plätt-

2
C
1



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

1

chenagglutinierender vWF-Aktivität, eingesetzt werden.

Die Adsorption und Desorption des Faktor VIII/vWF kann in einem Puffer, enthaltend als Salz ein ein- oder zweiwertiges Metallion, erfolgen, wobei als Salz vorzugsweise NaCl verwendet wird.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird als Puffersystem zur Elution der an den Kationenaustauscher gebundenen Proteine eine Pufferlösung bestehend aus Puffersubstanzen, insbesondere Glycin, Phosphatpuffer oder Citratpuffer, und Salz verwendet.

Der Elutionspuffer kann einen pH-Wert im Bereich zwischen 4,5 bis 8,5, vorzugsweise zwischen $\geq 7,0$ und $\leq 8,5$ aufweisen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann als Batch-Verfahren oder als Säulenchromatographie durchgeführt werden.

Die optimalen Parameter wie Salzkonzentration, pH-Wert und Temperatur zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind jedoch jeweils abhängig vom verwendeten Kationenaustauschermaterial. Es liegt jedoch im allgemeinen Wissen eines Fachmannes, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung offenbarten Bedingungen zur Durchführung des Verfahrens für den jeweilig eingesetzten Kationenaustauschertyp zu optimieren.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren wird insbesondere ein Faktor VIII/vWF-Komplex gewonnen und angereichert, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält.

Die gewonnene Faktor VIII/vWF-Komplex-Fraktion ist im wesentlichen frei von niedermolekularen vWF-Multimeren, vWF-Fragmenten mit geringer spezifischer Aktivität und kontaminierenden Nukleinsäuren.

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von gereinigtem Faktor VIII/vWF-Komplex mit dem erfindungsgemäßen Verfahren kann jede Faktor VIII-Komplex-haltige Lösung eingesetzt werden. Ausgangsmaterialien sind insbesondere biologische Materialien, wie Plasma, eine Plasmafraktion, Kryopräzipitat, oder ein Überstand oder



.

.

ein Extrakt einer rekombinanten Zellkultur.

Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Lösungen können jedoch auch angereicherte Proteinlösungen sein, die durch einen vorangegangenen Schritt, etwa über Gelfiltration, Anionenaustauscherchromatographie, Affinitätschromatographie oder einer Kombination davon, vorgereinigt oder angereichert sind.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als Ausgangslösung eine über einen Anionenaustauscher angereicherte Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Fraktion eingesetzt. Bei der anschließenden Kationenaustauscherchromatographie erfolgt dann eine Reinigung und Trennung von Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend hochmolekulare bzw. niedermolekulare vWF-Multimere. Es sind jedoch auch andere Kombinationen, wie etwa Affinitäts-/Kationenaustauscher-Chromatographie, Anionenaustauscher-/Affinitäts-/Kationenaustauscherchromatographie möglich, um eine Anreicherung und selektive Gewinnung von Faktor VIII/vWF mit verbesserter spezifischer Aktivität und Stabilität zu erreichen.

Mit dem oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren wird Faktor VIII/vWF mit verbesserter spezifischer Aktivität aus einem unreinen Faktor VIII/vWF-haltigen Material vielfach angereichert.

Da prinzipiell jedes biologische Material mit infektiösen Keimen kontaminiert sein kann, wird zur Herstellung eines virussicheren Präparates die gewonnene Faktor VIII/vWF-haltige Fraktion zur Inaktivierung bzw. Abreicherung von Viren behandelt. Dazu können alle aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren, wie chemisch/physikalische Methoden, Inaktivierung durch Kombination einer photoaktiven Substanz und Licht oder Abreicherung durch Filtration eingesetzt werden. Zur Inaktivierung von Viren eignet sich insbesondere eine Hitzebehandlung in Lösung bzw. in festem Zustand, welche sowohl lipidumhüllte als auch nicht-lipidumhüllte Viren verlässlich inaktivieren kann. Die Virusabreicherung erfolgt vorzugsweise durch eine Filtration über Nanofilter.

Gemäß einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung gereinigten Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie zur Verfügung. Faktor VIII/vWF mit erhöhter spezifischer vWF-Aktivität von vorzugsweise mindestens 66 U/mg Protein und erhöhter spezifischer Faktor VIII-Aktivität von vorzugsweise mindestens 500 U/mg Protein wird ausgehend von einem Ausgangsmaterial enthaltend u.a. Faktor VIII/vWF mit geringer Reinheit und niedriger spezifischer Aktivität angereichert und Begleitproteine, insbesondere nicht oder schwach gebundener und damit freier Faktor VIII bzw. Faktor VIII-Komplex mit geringer vWF-Aktivität, werden selektiv abgetrennt. Dadurch wird ein Faktor VIII/vWF-Komplex gewonnen, der hochmolekulare vWF-Multimere enthält und im wesentlichen frei ist von Faktor VIII-Komplex mit niedermolekularen vWF-Multimeren, vWF-Abbauprodukten, nicht-komplexiertem Faktor VIII und möglicherweise Faktor VIIIa. Der erfindungsgemäße Faktor VIII/vWF-Komplex weist aufgrund der selektiven Anreicherung von hochmolekularen vWF-Multimeren eine verbesserte Plättchenagglutinationsaktivität und eine erhöhte Stabilität auf.

Gemäß einem weiteren Aspekt wird ein Faktor VIII:C im wesentlichen frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung, durch Kationenaustauschchromatographie und stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 200 mM und ≤ 300 mM zur Verfügung gestellt.

Gemäß einem weiteren Aspekt wird eine gereinigte Präparation enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, oder Faktor VIII:C, im wesentlichen frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität, zur Verfügung gestellt.

Bei Gewinnung und Herstellung der erfindungsgemäßen Präparation mit einem Ausgangsmaterial plasmatischen oder rekombinanten Ursprungs wird, wie oben beschrieben, zur Entfernung von infektiösen Partikeln gegebenenfalls ein Virusabreicherungs/oder Inaktivierungsverfahren durchgeführt, wobei eine Virusinaktivierung

und/oder Virusabreicherung prinzipiell vor oder nach jedem Reinigungsschritt ausgehend vom Ausgangsmaterial bis zur hergestellten pharmazeutischen Zubereitung erfolgen kann. Damit ist die erfindungsgemäße Präparation in jedem Fall virussicher und frei von infektiösem Material.

Ein weiteres Kriterium für die Reinheit und geringe Infektiosität eines Produktes ist auch die Abwesenheit von kontaminierenden Nukleinsäuren. Die erfindungsgemäße Präparation ist daher im wesentlichen frei von Nukleinsäuren. "Im wesentlichen" bedeutet hier, daß der Gehalt an Nukleinsäure $\leq 0,7$ bezogen auf das Verhältnis 260/280 nm ist. Die Nukleinsäure kann jedoch auch gemäß einem Verfahren, wie es beispielsweise in der EP 0 714 987 und der EP 0 714 988 beschrieben wird, quantifiziert werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt liegt die erfindungsgemäße Präparation in einer lagerstabilen Form vor. Die Präparation enthaltend gereinigten Faktor VIII/vWF mit verbesserter spezifischer vWF-Aktivität kann als fertige Lösung, Lyophilisat oder tiefgefroren bereitgestellt werden. Aufgrund ihrer Reinheit ist die Präparation besonders stabil. Es hat sich gezeigt, daß die erfindungsgemäße Präparation bei -20°C für mindestens 6 Monate, bei 4°C in Lösung für mindestens 4 Wochen und als Lyophilisat für mindestens 1 Jahr stabil ist. Es zeigte sich, daß innerhalb des jeweiligen Zeitraumes die Faktor VIII/vWF-Aktivität um maximal 10% reduziert wird und das Multimermuster der vWF-Multimere keine wesentliche Änderung zeigt.

Die Formulierung der erfindungsgemäßen Präparation kann in an sich bekannter und üblicher Weise erfolgen. Der gereinigte Faktor VIII/vWF, enthalten in der erfindungsgemäßen Präparation, wird mit einem Puffer enthaltend Salze, wie NaCl, Trinatriumcitratdihydrat und/oder CaCl_2 , und Aminosäuren, wie Glycin und Lysin, bei einem pH im Bereich von 6 bis 8 gemischt und als pharmazeutisches Präparat formuliert.

Die Präparation kann zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit Hämophilie, phänotypischer Hämophilie und vWD verwendet werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparation aus Plasma oder einer Plasmafraktion, welche dadurch gekennzeichnet ist, daß Plasma oder eine Plasmafraktion mit einem Kationenaustauscher kontaktiert wird, wobei der Faktor VIII/vWF-Komplex adsorbiert wird, der mit Faktor VIII/vWF-Komplex beladene Kationenaustauscher gegebenenfalls gewaschen wird, anschließend der Faktor VIII/vWF-Komplex eluiert wird, wobei ein Eluat mit einer bezüglich dem Faktor VIII/vWF-Komplex mindestens 300-fachen Reinheit und einer Ausbeute an Faktor VIII/vWF-Komplex von mindestens 50% gegenüber Plasma erhalten wird, und schließlich das erhaltene Eluat zu einer Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparation aufgearbeitet wird.

Überraschenderweise wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellt, daß der Faktor VIII/vWF-Komplex mit einer Kationenaustauscherchromatographie ausgehend von Plasma oder einer Plasmafraktion in hoher Reinheit und gleichzeitig mit hoher Ausbeute zur Verfügung gestellt werden kann.

Als Plasmafraktion wird beispielsweise ein Kryopräzipitat, eventuell nach vorheriger Adsorptionsbehandlung zur Entfernung von Prothrombin-Komplex, oder eine Cohn-Fraktion eingesetzt.

Das Verfahren eignet sich hervorragend zur Reinigung des Faktor VIII-Komplex aus einer Plasmafraktion im industriellen Maßstab, da aufgrund der effektiven Reinigung eine Vielzahl von weiteren Reinigungsschritten, z.B. weiteren chromatographischen Reinigungsschritten, nicht erforderlich ist. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß der Faktor VIII-Komplex durch die einfache Kationenaustauscherchromatographie mit einer mindestens 300-fachen Reinheit gegenüber Plasma, vorzugsweise mindestens 400-fachen Reinheit, erhalten werden kann, mit einer gleichzeitig hohen Ausbeute von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 60%, bezogen auf Plasma. Es ist daher bevorzugt, das Reinigungsverfahren derart zu gestalten, daß nur eine einzige chromatographische Reinigung vorgenommen wird, nämlich die an dem Kationenaustauscher. Diese chromatographische Reinigung wird üblicherweise als terminaler Reinigungsschritt vorgenommen, bevor der Faktor

- 11 -

VIII-Komplex zu einer pharmazeutischen Präparation formuliert wird.

Üblicherweise wird das Ausgangsmaterial in einem kalziumhaltigen Puffer auf den Kationenaustauscher aufgetragen. Unmittelbar vor dem Auftragen bietet sich auch eine Maßnahme zur Inaktivierung von potentiell vorhandenen Viren an, wie humanpathogene Viren, die durch Blut übertragbar sind. Dabei ist eine Behandlung mit einem viriziden Detergens bzw. einem organischen Lösungsmittel und/oder Detergens bevorzugt. Eine Behandlung mit Triton oder Tween in Gegenwart von TNBP (Tri(n-butyl)phosphat) wird beispielsweise gemäß der EP 0 131 740 durchgeführt. Durch die anschließende Kationenaustauscherchromatographie wird das viruzide Mittel effektiv entfernt. Falls der adsorbierte Komplex gewaschen wird, wird diese Waschung bevorzugterweise mit einem Waschpuffer durchgeführt, dessen Ionenstärke über der des Adsorptionspuffers liegt, beispielsweise 10 bis 30% höher. Zur Elution des Faktor VIII/vWF-Komplexes wird vorzugsweise die Ionenstärke weiter erhöht. Die Elution des Faktor VIII/vWF-Komplexes wird durch die Erhöhung der Ionenstärke erreicht, welche vorzugsweise um mindestens 50%, am meisten bevorzugt um mindestens 100%, gegenüber der Ionenstärke der Ausgangslösung erhöht ist. Der Elutionspuffer enthält vorzugsweise Natriumchlorid. Zur Formulierung einer pharmazeutischen Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparation wird üblicherweise diafiltriert und sterilfiltriert, sowie gegebenenfalls lyophilisiert.

Die Aktivität des Faktor VIII bzw. vWF wird durch die Kationenaustauscherchromatographie kaum beeinträchtigt. Es hat sich herausgestellt, daß die Ausbeute des Faktor VIII-Komplexes von mehr als 90% bezogen auf die Aktivität vor der Chromatographie gewährleistet ist. Deshalb kann auch während der chromatographischen Reinigung auf übliche Stabilisatoren des Faktor VIII, wie z.B. Antithrombin III und/oder Heparin verzichtet werden.

Im Gegensatz zu im Stand der Technik bekannten Verfahren, in welchen die Kationenaustauscherchromatographie stets nur für bereits aufgereinigte Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparationen in Erwägung gezogen worden ist (vgl. EP 0 600 480-A2), hat sich

erfindungsgemäß gezeigt, daß sich die Kationenaustauscherchromatographie ausgezeichnet zur direkten Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex aus Plasma oder einer (rohen) Plasmafraktion eignet. Mit einem derartigen Verfahren ist es nicht einmal notwendig, zur Herstellung einer Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparation weitere chromatographische Verfahren vorzusehen, da die Reinheit, die durch die Kationenaustauscherchromatographie ausgehend von Plasma oder einer Plasmafraktion erzielt wird, bereits den Anforderungen an kommerzielle Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparate genügt.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele und der Zeichnungsfiguren näher erläutert, wobei sie jedoch nicht auf diese Ausführungsbeispiele beschränkt ist.

Es zeigen:

Figur 1: vWF-Multimer-Analyse von Faktor VIII/vWF-Komplex aus Kryopräzipitat vor und nach Reinigung mit Kationenaustauscher

Figur 2: vWF-Multimer-Analyse von Faktor VIII/vWF-Komplex aus Kryopräzipitat vor und nach Reinigung mittels kombinierter Anionen/Kationenaustauscherchromatographie

Beispiel 1 beschreibt die Reinigung von plasmatischem Faktor VIII/vWF-Komplex durch Kationenaustauscherchromatographie und stufenweiser Elution; Beispiel 2 beschreibt die Reinigung von Faktor VIII/vWF-Komplex durch Kombination von Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie und stufenweiser Elution vom Kationenaustauscher; Beispiel 3 beschreibt die Reinigung von rvWF/rFaktor VIII-Komplex mittels Kationenaustauscher; Beispiel 4 beschreibt die Isolierung des Faktor VIII/vWF-Komplexes über Kationenaustausch.

B e i s p i e l 1:

Reinigung von plasmatischem FVIII-Komplex durch Kationenaustauscherchromatographie

Kryopräzipitat aus humanem Plasma wurde in Natrium-Acetat-Puf-

fer, pH 7, aufgelöst und es wurden 20 Einheiten Heparin pro ml Lösung zugegeben. Pro 1 g Kryopräzipitat wurden 0,25 ml 2% $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Suspension zugegeben, und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde für 20 Minuten bei 10000 RPM zentrifugiert, um ein trübungsfreies Kryopräzipitat zu erhalten.

Eine Chromatographiesäule wurde mit Fractogel® EMD-SO3 gefüllt und mit Puffer (30 mM Glycin-NaCl-Puffer) gespült. Anschließend wurde aufgelöstes Kryopräzipitat durch die Kationenaustauschersäule filtriert und im Durchfluß wurden solche Proteine erhalten, die nicht an den Austauscher binden (Fraktion 1). Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit 0,3 M NaCl in Puffer entfernt (Fraktion 2). Anschließend wurde FVIII/vWF-Komplex von der Austauschersäule durch Elution mit 0,4 M bzw. 0,5 M NaCl eluiert (Fraktion 3 bzw. Fraktion 4).

Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, daß sowohl vWF als auch FVIII durch den Kationenaustauscher gebunden wurden. Durch Spülen der Kationenaustauschersäule mit 0,3 M NaCl (Fraktion 2) wurden kein vWF und nur 10 % der FVIII-Aktivität erhalten. Durch diese Elutionsstufe wurde der FVIII, der nicht als Komplex mit funktionell aktivem vWF vorlag, abgetrennt. Durch anschließende Desorption mit 0,4 M NaCl (Fraktion 3) wurde FVIII/vWF-Komplex erhalten, der etwa 20 % des funktionell aktiven vWF und etwa 30 % der Gesamtmenge an FVIII enthielt. Der restliche FVIII-Komplex wurde anschließend mit 500 mM NaCl vom Kationenaustauscher eluiert (Fraktion 4). Fraktion 4 enthielt Faktor VIII/vWF-Komplex, der 80 % der vWF-Aktivität und 50 % der FVIII-Aktivität ausgehend vom Kryopräzipitat beinhaltet. Durch die Kationenaustauschromatographie kam es zu einer 20-fachen Reinigung von FVIII (spezifische Aktivität: 12 IU FVIII:C/mg Protein) gegenüber Kryopräzipitat bzw. zu einer 350-fachen Aufreinigung von FVIII bezogen auf Plasma (Fraktion 4). Aus der Fraktion 3 kann FVIII gewonnen werden.

Figur 1 zeigt die vWF-Multimer-Analyse von Faktor VIII/vWF-Komplex vor und nach Reinigung mit Kationenaustauscher, wobei Spur A das vWF-Multimermuster des Kryopräzipitats, Spur B des 300 mM NaCl-Eluats (Fraktion 2, Tabelle 1), Spur C des 400 mM

NaCl-Eluats (Fraktion 3, Tabelle 1) und Spur D des 500 mM Eluats (Fraktion 4, Tabelle 1) darstellt. Aus Figur 1 ist ersichtlich, daß durch die Kationenaustauscherchromatographie ein Faktor VIII/vWF-Komplex mit hochmolekularen vWF-Multimerstruktur erhalten wird. Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere wird entweder nicht an den Kationenaustauscher gebunden (Fraktion 1) oder bei der Elution mit 0,3 M NaCl abgetrennt (Fraktion 2).

Tabelle 1: Reinigung von FVIII/vWF-Komplex aus Kryopräzipitat mittels Kationenaustauscherchromatographie

Probe	vWF:Risto-CoF-Aktivität (U/ml)	FVIII:C-Aktivität (U/ml)
Kryopräzipitat	2,2	2,4
Fraktion 1 (Nicht gebunden)	0	0
Fraktion 2 (Eluat 300 mM NaCl)	0	0,1
Fraktion 3 (Eluat 400 mM NaCl)	1,8	3,6
Fraktion 4 (Eluat 500 mM NaCl)	1,8	1,5

B e i s p i e l 2 :

Reinigung von plasmatischem FVIII/vWF-Komplex durch Kombination von Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie

Kryopräzipitat aus humanem Plasma wurde in einem Puffer aus 7 mM Tris, 100 mM Na-Acetat, 100 mM Lysin, 120 mM NaCl bei pH 6,7 aufgelöst. Zur Vorbehandlung wurde $Al(OH)_3$ eingerührt. Anschließend wurde der Niederschlag durch Zentrifugation abgetrennt.

Auf diese Weise vorbehandeltes Kryopräzipitat wurde auf eine Säule Fractogel® EMD-TMAE aufgetragen. Nicht gebundene Proteine wurde durch Spülen der Säule mit Lösungspuffer erhalten (Frak-

tion 1). Diese Fraktion 1 enthielt 60 % der vWF-Aktivität, jedoch nur 10 % der FVIII-Aktivität. Durch Elution der Säule mit 400 mM NaCl (Fraktion 2) wurde anschließend FVIII/vWF-Komplex erhalten. Fraktion 2 enthielt die restliche vWF-Aktivität und 70 % der FVIII-Aktivität ausgehend vom Kryopräzipitat.

Tabelle 2: Reinigung von FVIII-vWF-Komplex durch Kombination von Anionen- und Kationenaustauscherchromatographie

Probe	vWF:RistoCoF-Aktivität (U/ml)	FVIII:C Aktivität (U/ml)
Kryopräzipitat	12,5	12,2
Fraktion 1 (nicht gebunden)	3,5	0,7
Fraktion 2 (Eluat 400 mM NaCl)	2,5	14,5

Der FVIII/vWF-Komplex der Fraktion 2 wurde mit 20 mM Glycin/NaCl-Puffer 4-fach verdünnt, und anschließend auf eine Kationenaustauschersäule Fractogel® EMD-SO3 aufgetragen. Nicht-bindende Proteine wurden in der Fraktion 1 erhalten. Schwach gebundene Proteine wurden durch Spülen der Säule mit 200 mM NaCl entfernt (Fraktion 2). Anschließend wurde stufenweise mit 400 mM NaCl (Fraktion 3) und 500 mM NaCl (Fraktion 4) eluiert. In den Fraktionen 3 und 4 wurden jeweils 45 % der vWF-Aktivität und 55 % bzw. 40 % der FVIII-Aktivitäten gefunden.

Tabelle 3: Reinigung von FVIII/vWF-Komplex durch Kombination von Anionen- und Kationenaustauscherchromatographie

Probe	vWF:RistoCoF Aktivität (U/ml)	FVIII:C Aktivität (U/ml)
Ausgang	0,63	3,6
Fraktion 1 (nicht gebunden)	0	0
Fraktion 2 (Eluat 200 mM NaCl)	0	0
Fraktion 3 (Eluat 400 mM NaCl)	0,3	2,26
Fraktion 4 (Eluat 500 mM NaCl)	0,25	1,43

Aus der Tabelle 3 ist ersichtlich, daß sowohl vWF als auch FVIII durch den Kationenaustauscher gebunden werden. Durch Spülen der Kationenaustauschersäule mit 0,2 M NaCl (Fraktion 2) wurde kein aktiver vWF und kein FVIII gefunden. Der FVIII/vWF-Komplex wurde anschließend in den Fraktionen 3 und 4 eluiert.

Während die spezifische Aktivität des FVIII:C im Kryopräzipitat 0,59 U/mg Protein betrug, beträgt die spezifische Aktivität des FVIII:C in den Fraktionen 3 und 4 500 U/mg Protein bzw. 477 U/mg Protein. Die spezifische Aktivität des vWF stieg ausgehend von Kryopräzipitat von 0,6 U/mg Protein auf 66 U/mg Protein und 83 U/mg Protein in den Fraktionen 3 und 4.

Figur 2 zeigt die vWF-Multimer-Analyse von Faktor VIII/vWF-Komplex vor und nach Reinigung mit kombinierter Anionen-/Kationenaustauscherchromatographie, wobei die Spuren a bis c die Chromatographie am Anionenaustauscher und die Spuren d bis g am Kationenaustauscher zeigen. Fig. 2 zeigt in Spur a das vWF-Multimermuster des Kryopräzipitats, Spur b des Durchlaufs (Fraktion 1, Tabelle 2), Spur c des 400 mM NaCl-Eluats (Fraktion 2, Tabelle 2), Spur d des 400 mM NaCl-Eluats (Fraktion 2, Tabelle 2) vor Kationenaustauscher, Spur e des 200 mM NaCl-Eluats (Fraktion 2, Tabelle 3), Spur f des 400 mM NaCl-Eluats (Fraktion 3, Tabelle 3) und Spur g des 500 mM NaCl-Eluats (Fraktion 4, Tabelle 3).

B e i s p i e l 3 :

Reinigung eines r-vWF/r-FVIII-Komplexes mittels Kationenaustauscherchromatographie (Derzeit nach Ansicht der Anmelderin der beste Weg zur Ausführung der Erfindung)

1000 ml eines Zellkulturüberstandes, enthaltend rekombinanten rFVIII/rvWF-Komplex, wurden auf eine Säule, gefüllt mit 20 ml Fractogel® TSK-SO3, aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit Puffer, pH 7,4, mit 250 mM NaCl, wurde der gebundene rFVIII/rvWF-Komplex mit einem Puffer, pH 7,4, mit 600 mM NaCl eluiert. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dieses Säulenlaufes dargestellt.

Tabelle 4: Reinigung von rekombinanten rFVIII/rvWF-Komplex mittels Kationenaustauscherchromatographie

Probe	FVIII:C Aktivität (U/ml)	vWF:RistoCoF-Aktivität (U/ml)
Ausgang	2,3	0,1
Durchfluß	0,1	0
250 mM NaCl-Eluat	0,2	0
600 mM NaCl-Eluat	85	4,4

Das Beispiel zeigt, daß ein Komplex bestehend aus rekombinantem FVIII und rekombinantem vWF (der normalerweise während der Fermentation von rekombinantem FVIII anfällt) an einen Kationenaustauscher bindet und selektiv durch Erhöhung der Salzkonzentration, von Begleitproteinen getrennt, eluiert werden kann.

In dem Beispiel wurde ein rFVIII/rvWF-Komplex mit einer spezifischen FVIII-Aktivität von 130 U/mg Protein in einer Ausbeute von 75% erhalten. Dies entspricht einem Reinigungsfaktor von 28 für diesen Schritt. Die spezifische Aktivität des r-vWF hängt stark von der Qualität des exprimierten r-vWF ab. In diesem Fall lag sie bei 7 U/mg im Eluat, was einem Reinigungsfaktor von 35 entspricht.

Durch Variation des rFVIII/rvWF-Verhältnisses im Ausgang, oder

- 18 -

durch Anschließen eines weiteren chromatographischen Schrittes, kann die spezifische Aktivität des FVIII:C noch weiter verbessert werden.

B e i s p i e l 4 :

Isolierung des FVIII/vWF-Komplexes über Kationenaustausch

B e i s p i e l 4A:

210 g Kryopräzipitat werden in 950 ml CaCl_2 -heparinhaltigem Citratpuffer gelöst und auf pH 6,0 gestellt. Unlösliche Anteile, hauptsächlich Fibrinogen, wurden abtrennt. Zur Inaktivierung von eventuell vorhandenen pathogenen Viren wurde die klare Lösung mit 1 % Triton X100 und 0,3 % TNBP (Tri(n-butyl)phosphat) behandelt. 100 ml Fractogel EMD- SO_3^- -650(M) der Fa. Merck, Darmstadt (DE), wurden zur Adsorption des virusinaktivierten FVIII herangezogen, das zuvor bei pH 6,0 in einer acetatgepufferten NaCl-Lösung mit einer Leitfähigkeit von 10 mS/cm äquilibriert wurde. Der FVIII wurde durch Erhöhung der Ionenstärke auf 500 mM NaCl vom Gel abeluiert; vorher wurde eine Waschung mit 500 ml 150 mM NaCl-Lösung durchgeführt.

B e i s p i e l 4B:

Statt Fractogel EMD- SO_3^- wurde in diesem Beispiel Toyopearl SP-550C verwendet.

E r g e b n i s s e :

	Ausbeute/Plasma		Reinheitsgrad gegenüber Plasma
	FVIIIc	FvWF	
Beispiel 4A	62 %	68 %	450 X
Beispiel 4B	56 %	62 %	370 X

FVIIIc und FvWF sind in derselben Fraktion gewonnen worden.

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verfahren zur Gewinnung von Faktor VIII/vWF-Komplex, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus einer Proteinlösung an einen Kationenaustauscher gebunden und durch stufenweise Elution Faktor VIII/vWF-Komplex, der insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere enthält, gewonnen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex bei einer Salzkonzentration von ≤ 250 mM an einen Kationenaustauscher gebunden wird und Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend niedermolekulare vWF-Multimere, Faktor VIII frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität und Faktor VIII:C bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 250 mM und ≤ 300 mM eluiert und gewonnen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, durch stufenweise Fraktionierung bei einer Salzkonzentration von ≥ 300 mM, vorzugsweise ≥ 350 mM gewonnen wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine Faktor VIII/vWF-Komplex-haltige Fraktion gewonnen wird, die insbesondere frei ist von niedermolekularen vWF-Multimeren und vWF-Abbauprodukten, nicht-komplexierten, oder schwach an vWF gebundenem Faktor VIII und kontaminierenden Nukleinsäuren.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Elution der Polypeptide vom Kationenaustauscher in einem Puffersystem mit einem pH-Wert im Bereich zwischen 4,5 und 8,5, vorzugsweise $\geq 7,1$ und $\leq 8,5$ erfolgt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Kationenaustauscher ein Sulfopropyl- oder Carboxymethyl-Gruppen konjugierte Träger ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein Faktor VIII/vWF-Komplex enthaltend insbeson-

dere hochmolekulare vWF-Multimere gewonnen wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 dadurch gekennzeichnet, daß Faktor VIII/vWF-Komplex aus Plasma, einer Plasmafraktion, Kryopräzipitat, dem zellfreien Überstand oder Extrakt einer rekombinanten Zellkultur, oder einer angereicherten Proteinfraktion gewonnen wird.

9. Faktor VIII/vWF-Komplex, enthaltend insbesondere hochmolekulare vWF-Multimere, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie.

10. Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß er insbesondere frei ist von niedermolekularen vWF-Multimeren, inaktiven vWF-Abbauprodukten und Faktor VIII frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität und von Faktor VIIIa-Aktivität.

11. Faktor VIII/vWF-Komplex nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß er eine spezifische vWF-Aktivität von mindestens 66 U/mg Protein und eine spezifische Faktor VIII-Aktivität von mindestens 500 U/mg Protein aufweist.

12. Faktor VIII:C im wesentlichen frei von plättchenagglutinierender vWF-Aktivität, erhältlich aus einer Faktor VIII/vWF-haltigen Lösung durch Kationenaustauscherchromatographie und stufenweise Elution bei einer Salzkonzentration zwischen ≥ 200 mM und ≤ 300 mM.

13. Präparation enthaltend Faktor VIII/vWF-Komplex oder Faktor VIII:C gemäß einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie virussicher und frei von infektiösem Material ist.

14. Präparation nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer lagerstabilen Form vorliegt.

15. Präparation nach einem der Ansprüche 13 oder 14, dadurch ge-

kennzeichnet, daß sie als pharmazeutisches Präparat formuliert ist.

16. Verwendung einer Präparation nach einem der Ansprüche 13 bis 15 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Patienten mit Hämophilie A, phänotypischer Hämophilie und vWD.

17. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß von Plasma oder einer Plasmafraktion ausgegangen wird, und der Faktor VIII/vWF-Komplex in einer mindestens 300-fachen Reinheit und einer Ausbeute von mindestens 50% gegenüber Plasma erhalten wird.

18. Verfahren zur Herstellung einer Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparation aus Plasma oder einer Plasmafraktion, dadurch gekennzeichnet, daß Plasma oder eine Plasmafraktion mit einem Kationenaustauscher kontaktiert wird, wobei der Faktor VIII/vWF-Komplex adsorbiert wird, der mit Faktor VIII/vWF-Komplex beladene Kationenaustauscher gegebenenfalls gewaschen wird, anschließend der Faktor VIII/vWF-Komplex eluiert wird, wobei ein Eluat mit einer bezüglich dem Faktor VIII/vWF-Komplex mindestens 300-fachen Reinheit und einer Ausbeute an Faktor VIII/vWF-Komplex von mindestens 50% gegenüber Plasma erhalten wird, und schließlich das erhaltene Eluat zu einer Faktor VIII/vWF-Komplex-Präparation aufgearbeitet wird.

19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Eluieren des Faktor VIII/vWF-Komplexes vom Kationenaustauscher derart durchgeführt wird, daß das erhaltene Eluat Faktor VIII in einer Ausbeute enthält, die mindestens 90% der Faktor VIII-Aktivität vor der Adsorption an den Kationenaustauscher beträgt.

20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß beim Aufarbeiten des Faktor VIII/vWF-Präparats kein weiterer chromatographischer Reinigungsschritt vorgenommen wird.



FIG. 1

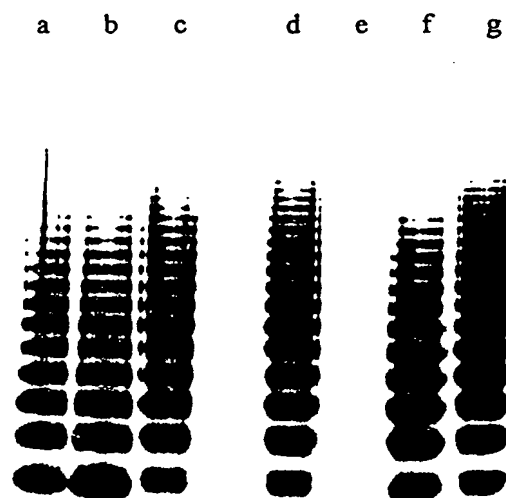


FIG. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 98/00043

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/755 A61K38/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 600 480 A (SCLAVO SPA ; AIMA DERIVATI SPA (IT)) 8 June 1994 see claims; example ---	1, 5, 6, 8-17
A	WO 93 15199 A (RHONE POULENC RORER SA) 5 August 1993 see claims; example 7 ---	1, 9
A	WO 91 13093 A (BIO TECHNOLOGY GENERAL CORP) 5 September 1991 see claims; example 4 ---	1, 9
X	EP 0 295 645 A (ZYMOGENETICS INC) 21 December 1988 see page 5, line 49 - page 6, line 3; claims 10-13; example 5 ---	1, 9, 10, 13-16
-/--		



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 June 1998

Date of mailing of the international search report

03/07/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/AT 98/00043

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 97 34930 A (IMMUNO AG ; FISCHER BERNHARD (AT); MITTERER ARTUR (AT); DORNER FRIE) 25 September 1997 see claims; examples ---	1,9-16
P,X	WO 97 39033 A (IMMUNO AG ; SCHOENHOFER WOLFGANG (AT); EIBL JOHANN (AT); WEBER ALFR) 23 October 1997 see claims; examples -----	1,9-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 98/00043

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0600480	A	08-06-1994	IT 1256622 B	12-12-1995
WO 9315199	A	05-08-1993	FR 2686899 A	06-08-1993
			EP 0624195 A	17-11-1994
			FI 943563 A	29-07-1994
			JP 7503368 T	13-04-1995
WO 9113093	A	05-09-1991	AU 645077 B	06-01-1994
			AU 7496491 A	18-09-1991
			CA 2077446 A	03-09-1991
			EP 0517826 A	16-12-1992
			FI 923935 A	02-09-1992
EP 0295645	A	21-12-1988	US 5200510 A	06-04-1993
			DK 331488 A	17-12-1988
			JP 1100196 A	18-04-1989
WO 9734930	A	25-09-1997	AT 403764 B	25-05-1998
			AT 49496 A	15-10-1997
WO 9739033	A	23-10-1997	AT 403765 B	25-05-1998
			AT 66796 A	15-10-1997



•

•

•

•



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Publication number:

0 600 480 A3

⑫

EUROPEAN PATENT APPLICATION

⑪ Application number: **93119439.3**

⑤ Int. Cl.⁵: **C07K 13/00, C07K 3/20**

⑫ Date of filing: **02.12.93**

③ Priority: **04.12.92 IT MI922778**

④ Date of publication of application:
08.06.94 Bulletin 94/23

⑧ Designated Contracting States:
AT CH DE DK ES FR GB IT LI NL SE

⑥ Date of deferred publication of the search report:
23.11.94 Bulletin 94/47

⑦ Applicant: **SCLAVO S.p.A.**
Via Fiorentina 1

I-53100 Siena (IT)

Applicant: **AIMA-DERIVATI S.p.A.**

I-55020 Castelveccchio Pascoli (Lucca) (IT)

⑦ Inventor: **Arrighi, Silvana**

Via della Chiuse 6

I-53010 Casciano di Murlo (Siena) (IT)

Inventor: **Borri, Maria Giuseppina**

Via Pallini 1

I-53100 Siena (IT)

Inventor: **Bucci, Enzo**

Via Toglatti 25

I-02010 Cittaducale (Rieti) (IT)

⑦ Representative: **Gervasi, Gemma, Dr. et al**
NOTARBARTOLO & GERVASI Srl

Viale Bianca Maria 33

I-20122 Milan (IT)

⑤ **Process for the extraction of factor VIII-von willebrand factor (FVIII:C-FVW) complex from total human plasma.**

⑤ A process for the extraction of Factor VIII - von Willebrand Factor (FVIII:C - FvW) complex from total human plasma is described, comprising unfreezing the plasma at room temperature after stabilization, selective absorption on anionic exchanger of factors constituting the protrombinic complex, extraction, on anionic exchanger as well, of Factor VIII - von Willebrand Factor (FVIII:C - FvW) complex and a further purification by means of a cationic exchanger of FVIII:C - FvW suitably stabilized and inactivated.

EP 0 600 480 A3



European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number
EP 93 11 9439

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.5)
Y	EP-A-0 303 329 (RIETHORST W.) * example 8 * ---	1-6	C07K13/00 C07K3/20
Y	EP-A-0 468 181 (SCLAVO SPA) * page 2, line 38 - page 3, line 55 * ---	1-6	
Y	WO-A-86 02838 (NORDISK GENTOFTE A/S) * example 6 * ---	1-6	
A,D	EP-A-0 416 983 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) * the whole document * ---	1-6	
A	WO-A-90 05140 (OCTAPHARMA AG) * the whole document * -----	1-6	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.5)
			C07K
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search THE HAGUE		Date of completion of the search 26 September 1994	Examiner Fernandez y Branas, F
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

⑫

EUROPEAN PATENT APPLICATION

⑲ Application number: 88109532.7

⑮ Int. Cl.⁴: **C07K 7/08 , C07K 3/18 ,**
A61K 37/02

⑳ Date of filing: 15.06.88

③① Priority: 16.06.87 US 62896
02.03.88 US 162877

④③ Date of publication of application:
21.12.88 Bulletin 88/51

⑤④ Designated Contracting States:
DE ES GB IT NL SE

⑦① Applicant: **ZYMOGENETICS INC.**
4225 Roosevelt Way, N.E.
Seattle Washington 98105(US)

⑦② Inventor: **Kumar, Anur Ashok**
4509 Fremont Avenue North Nr. 4
Seattle Washington 98103(US)
Inventor: **Hagen, Frederick S.**
3835 - 44th Avenue N.E.
Seattle Washington 98105(US)
Inventor: **Sledziewski, Andrzej Z.**
14543 - 30th Avenue N.E.
Seattle Washington 98155(US)

⑦④ Representative: **Brown, John David et al**
FORRESTER & BOEHMERT
Widenmayerstrasse 4/I
D-8000 München 22(DE)

⑤④ **Method for purifying factor VIII:C, Von Willebrand factor and complexes thereof.**

⑤⑦ Methods for purifying factor VIII:C, von Willebrand factor (vWF) or complexes thereof from heterogeneous biological fluids are disclosed. The methods utilize a binding peptide, specific to either factor VIII:C or vWF, bound to an insoluble matrix. Peptides suitable for use within the methods are also disclosed.

EP 0 295 645 A2

METHOD FOR PURIFYING FACTOR VIII:C, VON WILLEBRAND FACTOR AND COMPLEXES THEREOF

Cross-Reference to Related Application

This application is a continuation-in-part of U.S. Patent Application Serial No. 062,896, filed June 16, 1987, which application is pending.

Technical Field

The present invention is directed toward methods for purifying proteins in general, and more specifically, to methods for purifying factor VIII:C, von Willebrand factor and complexes thereof from heterogeneous biological fluids.

Background Art

Factor VIII:C procoagulant protein (also known as "Antihemophilic Factor") is a participant in the intrinsic pathway of blood coagulation, acting as a cofactor in the activation of factor X. Factor VIII:C procoagulant protein (factor VIII:C) circulates at low concentration (about 200 ng/ml) in the plasma as a non-covalently linked complex with von Willebrand factor (vWF).

Several hereditary disorders are associated with these two proteins. In individuals with the hereditary X chromosome-linked bleeding disorder, hemophilia A (also known as "classic hemophilia"), factor VIII:C activity is absent. Hemophilia A is the most common hereditary disorder of coagulation, affecting about six men in every 100,000 (Bloom, Nature 303:474-475, 1983). Von Willebrand's disease is a hereditary bleeding disorder which results in extended bleeding time due to reduced levels of active vWF. This disorder affects about one person in every 100,000 (L. Harke, Hemostasis Manual, 2d ed., F. A. Davis Co., Philadelphia, Pa., 1974). Currently, individuals affected by these two bleeding disorders are treated with concentrates rich in factor VIII:C and vWF. These protein concentrates, prepared from the pooled blood of a large number of donors, are expensive to produce and, though enriched for the specific factors required, still contain less than 1% factor VIII:C and are contaminated with other proteins. In addition, there is a risk of viral contamination (e.g., hepatitis viruses and HIV-I) in the concentrates due to the use of pooled human plasma as the source of these coagulation factors and many hemophiliacs receiving the concentrates have been infected.

Purification of factor VIII:C has been complicated by its low abundance in plasma, extreme lability, and association with von Willebrand factor. Although expression of cloned factor VIII:C in recombinant cells has been achieved (Wood et al., Nature 312:330-337, 1984; Toole et al., Nature 312:342-347, 1984; Truett et al., DNA 4:333-349, 1985), the recombinant proteins have not been extensively purified or characterized.

A number of purification methods for factor VIII:C have been attempted, although they are characterized by somewhat limited efficiency. For instance, Farrugia et al. (Thromb. Haemost. 51:338-342, 1984) described a factor VIII:C purification method which involved precipitation of factor VIII:C from plasma or cryoprecipitate with hydrophilic polymers, while Wagner et al. (Thromb. Diath. Haemorrh. 11:64, 1964) described the purification of factor VIII:C from plasma or cryoprecipitate using precipitation with lecithins. In addition, Madaras et al. (Haemost. 7:321-331, 1978) have described the purification of factor VIII:C from plasma or cryoprecipitate using chromatography on ion-exchange columns and gel filtration followed by heparin-sepharose affinity chromatography. Knutson and Fass (Blood 59:615-624, 1982) described a multistep process for the purification of porcine factor VIII:C. In general, these methods produce factor VIII:C in low yields and, in many cases, as a complex with vWF.

The preparation of highly purified bovine factor VIII:C derived from bovine plasma has been described by Vehar and Davie (Biochemistry 19:401-410, 1980) using gel filtration and chromatography on a factor X-sepharose column as the final step of the purification procedure. Tuddenham et al. (J. Lab. Clin. Med. 93:40-53, 1979) have described a method for purifying factor VIII:C using immunoaffinity chromatography. This method utilizes polyclonal antisera directed against vWF to adsorb the factor VIII:C-vWF complex from plasma. Purified factor VIII:C is eluted from the column using a calcium ion gradient. Austen (British J. Haemat. 43:669, 1979) described a method for separating factor VIII:C from contaminating plasma proteins using aminohexyl sepharose chromatography. These methods do not, however, result in a concentrated

product.

Zimmerman and Fulcher (U.S. Patent No. 4,361,509; 1982) have disclosed a method for preparing a concentrated high-purity factor VIII:C using a two-column method. The first column, consisting of monoclonal antibodies directed against vWF bound to agarose beads, served to purify factor VIII:C from the starting material. The second column, used for concentration of the purified factor VIII:C, consisted of aminoethyl-substituted agarose.

The major disadvantages posed by the use of immunoaffinity chromatography, as described by Tuddenham et al. (ibid.) and Zimmerman and Fulcher (ibid.), are in the regeneration and reusability of the affinity matrix and the contamination of the product with nonhuman antibodies. Immunoaffinity columns, as described above, bind the vWF portion of the factor VIII:C-vWF complex. Calcium ion treatment of the immunoaffinity column releases free factor VIII:C, but the vWF remains tightly bound to the column. However, the factor VIII:C purified by this method is often contaminated with nonhuman antibodies that have been leached from the column. Further, the tight bond between antibody and vWF necessitates the use of powerful desorption agents to achieve elution of the bound vWF as a prelude to reuse of the column. These procedures can lead to loss of the biological activity of the vWF and/or loss of the immunological properties of the antibody, resulting in a short-lived column. Use of such columns for the commercial preparation of factor VIII:C is therefore expensive, while their use for the isolation of biologically active vWF is difficult at best. Additionally, the use of strong desorption agents, some of which are toxic to human systems, requires their removal from the product before use.

In view of the disadvantages of current methods employed for purifying factor VIII:C and vWF, there is a need in the art for an alternative purification method which provides a high yield of pure factor VIII:C, vWF and/or the factor VIII:C-vWF complex. The present invention fulfills this need, and further provides other related advantages.

Disclosure of the Invention

Briefly stated, the present invention discloses methods for purifying factor VIII:C (FVIII:C), von Willebrand factor (vWF) or complexes thereof from heterogeneous biological fluids. The methods utilize a binding peptide, specific to either factor VIII:C or vWF, bound to an insoluble matrix.

In one aspect of the present invention directed toward purifying vWF, the method generally comprises (a) exposing the biological fluid to a peptide that specifically binds to vWF comprising at least a portion of the amino terminal 340 amino acids of glycoprotein Ib, the peptide being bound to an insoluble matrix, such that the vWF specifically binds to the peptide; (b) eluting the bound vWF from the peptide; and (c) collecting the vWF-containing eluate. The method may also include washing nonspecifically bound elements from the matrix, as well as concentrating the vWF subsequent to the step of collecting. Within a preferred embodiment, the step of eluting comprises exposing the bound vWF to a pH gradient or a high salt buffer. Within certain embodiments, the peptide consists of between approximately four and forty amino acids and comprises a sequence corresponding to a portion of amino acids 165-260 of glycoprotein Ib. The peptide may also be a peptide such as PEP-12, PEP-13, PEP-14, PEP-15, PEP-16 or PEP-17.

Within another aspect of the present invention, directed toward purifying factor VIII:C-vWF complexes, the method generally comprises (a) exposing the biological fluid to a peptide that specifically binds to von Willebrand factor, the peptide being bound to an insoluble matrix such that the factor VIII:C-vWF complex specifically binds to the peptide; (b) eluting the bound factor VIII:C-vWF complex from the peptide; and (c) collecting the factor VIII:C-vWF complex-containing eluate. The method may also include washing nonspecifically bound elements from the matrix as well as concentrating the collected complex.

Within a third aspect of the present invention, directed toward purifying factor VIII:C from a heterogeneous biological fluid, the method generally comprises (a) exposing the biological fluid to a peptide that specifically binds to von Willebrand factor (vWF), the vWF being complexed with factor VIII:C, the peptide being bound to an insoluble matrix, such that the factor VIII:C-vWF complex specifically binds to the peptide; (b) eluting the factor VIII:C from the complex; and (c) collecting the factor VIII:C-containing eluate. Within preferred embodiments, the peptide comprises at least a portion of factor X or factor IX. Within a particularly preferred embodiment, the peptide comprises all or a portion of glycoprotein Ib. The method may also include washing nonspecifically bound elements from the matrix, as well as concentrating the factor VIII:C subsequent to the step of collecting.

Another aspect of the present invention, directed toward purifying factor VIII:C, discloses a method generally comprising (a) dissociating the factor VIII:C-vWF complex within a heterogeneous biological fluid; (b) exposing the dissociated complex to a peptide that specifically binds to factor VIII:C, the peptide being

bound to an insoluble matrix, such that the factor VIII:C specifically binds to the peptide; (c) eluting the bound factor VIII:C from the peptide; and (d) collecting the factor VIII:C-containing eluate. The method may also include a washing step and/or concentrating step as described above.

Within yet another aspect of the present invention, directed toward purifying factor VIII:C from a heterogeneous biological fluid containing FVIII:C-vWF complexes, the method generally comprises: (a) exposing the biological fluid to a peptide that specifically binds to either FVIII:C or vWF, the peptide being bound to an insoluble matrix, such that the FVIII:C-vWF complex specifically binds to the peptide; (b) eluting the bound complex from the peptide; (c) dissociating the FVIII:C-vWF complex; and isolating the FVIII:C.

The present invention also discloses peptides suitable for use within the methods described above. These and other aspects of the present invention will become evident upon reference to the following detailed description and attached drawing.

Brief Description of the Drawing

The Figure depicts the nucleotide sequence and predicted amino acid sequence for a cDNA encoding the α chain of human glycoprotein Ib (GPIb). The amino terminus of the mature protein starts with +1, whereas the negative numbers (-16 through -1) represent the signal peptide.

Best Mode for Carrying Out the Invention

Prior to setting forth the invention, it may be helpful to an understanding thereof to define certain terms to be used hereinafter.

Heterogeneous Biological Fluid: Any fluid containing cells, portions of cells, or cell products and including one or more proteins. Heterogeneous biological fluids include, but are not limited to, blood, plasma, serum, cell lysates, cell-conditioned media and fractions thereof.

As noted above, the present invention provides a method for purifying factor VIII:C and/or vWF utilizing a binding peptide specific to either factor VIII:C or vWF, bound to an insoluble matrix. The use of binding peptides to purify factor VIII:C, vWF and complexes thereof has major advantages over current purification methods. A binding peptide, as described above, preferably of 40 amino acids or less, may be commercially synthesized at a fraction of the cost of producing antibodies specific to vWF or factor VIII:C. Further, the binding peptides described herein bind vWF or factor VIII:C in a non-covalent manner such that the product may be eluted as a complex (vWF-factor VIII:C) or as a pure product (factor VIII:C or vWF alone). Elution of the products using high ionic strength buffers will not damage the binding peptide and will result in a column that is ready for reuse with a minimum of pretreatment. Another major advantage of the invention is that the binding peptide is of human origin. In the event that some of the binding peptide becomes uncoupled from the matrix and contaminates the product, it will be less immunogenic compared to heterologous antibodies, and the small size of the peptide will result in its rapid clearance from the plasma. As a result, any peptide contaminants present in the final preparation should not interfere with the normal function of the product.

Binding peptides suitable for use in purifying factor VIII:C and/or von Willebrand factor may be derived from glycoprotein Ib, factor IX, factor X, von Willebrand factor and factor VIII. These proteins interact with factor VIII:C or vWF in a specific manner.

In plasma, vWF and factor VIII:C exist as a non-covalently bound complex (for review, see L. W. Hoyer, Blood 58:1-13, 1981). The two proteins may be separated by treatment with a high ionic strength buffer, such as 0.25 M - 0.5 M CaCl_2 or 1 M NaCl.

Glycoprotein Ib (GPIb) is a platelet receptor which interacts with vWF to facilitate the adhesion of platelets to exposed subendothelial collagen. GPIb is a heterodimer composed of disulfide-linked α - and β -chains, the α -chain being the chain which contains the vWF binding domain (Okumura et al., J. Biol. Chem. 253:3435-3443, 1978).

Binding peptides for use in carrying out the present invention may be isolated by one of three general methods. The first method involves the synthesis of overlapping peptides of about 10 to 40 amino acids, preferably about 20 amino acids, in length. Such peptides may be synthesized according to procedures which are well known in the art (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963; Houghten, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5131-5135, 1985) or the peptides may be manufactured upon request through such commercial suppliers as Applied Biosystems (Foster City, Calif.), or Biosearch (San Rafael, Calif.). The

peptides correspond to the amino acid sequence of one of the binding proteins (glycoprotein Ib, factor IX, factor X or vWF) or a suitable portion of the binding protein. The peptides are then bound to an insoluble matrix or support, such as a microtiter plate, and a solution containing factor VIII:C, von Willebrand factor, or factor VIII:C-vWF complex is added. After an incubation period, unbound protein is removed and labeled antibodies directed against factor VIII:C or vWF are added. After incubation, excess antibodies are removed and the amount of bound antibody is measured. The amount of antibody bound is proportional to the ability of the peptide to bind the protein of interest. Alternatively, binding may be measured directly using labeled factor VIII:C or vWF.

A second method of identifying binding peptides relies on genetic engineering techniques to determine a suitable binding region of the binding protein involved in the specific interaction. A cDNA sequence encoding the binding protein is cloned into a plasmid vector such that expression of the cDNA is under the control of a phage T7 promoter. The plasmid is isolated and transcribed *in vitro* essentially as described by Melton et al. (Nuc. Acids Res. 12:7035-7056, 1984), using T7 polymerase. The resultant RNA is used as a template for cDNA cloning by the random priming method (Maniatis et al., eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982), and the cDNA thus produced is used to prepare a λ gt11 expression library (Young and Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:1194, 1983). The library is screened by the ligand blotting technique (Sikela and Hahn, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3038-3042, 1987) using the labeled protein of interest as a probe. Clones which express binding peptides are mapped to determine the precise location and sequence of a suitable binding peptide.

A third method of isolating suitable peptides relies on digestion of purified binding proteins by limited proteolytic and chemical cleavage. Suitable digestion methods include CNBr cleavage and cleavage with proteolytic enzymes, such as trypsin, chymotrypsin, lysine endopeptidase or *S. aureus* V-8 protease. The proteins are isolated from plasma sources (for example, as described by Chopek et al., Biochemistry 25:3146-3155, 1986 or Osterud and Rapaport, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5260-5264, 1977) or are produced in recombinant cells (e.g., Hagen et al., EP 200,421). DNA sequences encoding factor IX (Kurachi and Davie, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6461-6464, 1982; Anson et al., Nature 315:683-685, 1985), factor X (Leytus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3699-3702, 1984; Leytus et al., Biochemistry 25:5098-5102, 1986), von Willebrand factor (Sadler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6394-6398, 1985; Ginsberg et al., Science 228:1401-1406, 1985) and factor VIII (Toole et al., Nature 312:342-347, 1984) have been described.

Binding peptides specific to either vWF or factor VIII:C are identified and synthesized as described above and are subsequently coupled to one of a variety of commercially available insoluble matrices. Exemplary matrices include CNBr-activated sepharose 4B (Pharmacia, Sweden), AH-sepharose 4B (Pharmacia), CH-sepharose 4B (Pharmacia), activated CH-sepharose 4B (Pharmacia), Affi-Gel (Bio-Rad, Richmond, Calif.) and Reacti-Gel (GF-2000) (Pierce Chemical Company, Rockford, Ill.). The coupling reaction used to bind the peptide to the matrix is one of a variety of procedures known in the literature. Coupling reactions may use any of the following peptide functions: the amino function of the peptide or ligand (Axen et al., Nature 214:302, 1967; Bethell et al., J. Biol. Chem. 254:2572-2574, 1979; B. S. Coller, Blood 55:169, 1980); the carboxy function of the peptide or ligand (B. T. Kaufman and J. V. Pierce, Biochem. Biophys. Res. Commun. 44:608-613, 1971); or thiol groups (L. Ruden and H. F. Deutsch, J. Biol. Chem. 253:519-524, 1978). Spacers between the column matrix and the binding peptide may also be used to enhance the efficiency of purification (Pantoliano et al., Biochem. 23:1037-1042, 1984). It may be desirable to add a lysine or cysteine residue to the end of the peptide to facilitate coupling to the matrix. As noted above, the affinity purification system described herein may be used to purify factor VIII:C or von Willebrand factor or complexes thereof from a variety of heterogeneous biological fluids. These include plasma, plasma-derived concentrates and cell lysates and media from recombinant cells. Methods for producing factor VIII:C in recombinant cells are described by Wood et al. (*ibid*), Toole et al. (*ibid*) and Truett et al. (*ibid*). Kaufman and Adamson (WO 87/04187) disclose methods of producing factor VIII:C-type proteins using recombinant cells which are cultured in the presence of vWF.

For purification of factor VIII:C, vWF or factor VIII:C-vWF complex, the biological fluid is exposed to the matrix-bound peptide under conditions such that vWF or factor VIII:C-vWF complex binds to the peptide. Subsequent to the step of exposing, it is preferred that nonspecifically bound elements be washed from the column. The column may be washed with a low ionic strength buffer of approximately neutral pH, preferably the same buffer used in loading the column. A particularly preferred buffer is 20 mM imidazole, pH 6.8 containing 150 mM NaCl. The bound complex or the protein of interest is then eluted from the column and collected. For purification of factor VIII:C or vWF, elution may be achieved through the use of a pH gradient or a high ionic strength buffer. Factor VIII:C-vWF complex is preferably eluted through the use of a pH gradient. To purify factor VIII:C from factor VIII:C-vWF complex, the factor VIII:C is either eluted from the

column using a high ionic strength buffer or the complex is eluted and subsequently dissociated in a high ionic strength buffer. In a preferred embodiment, the collected protein is concentrated. Preferred methods of concentrating include lyophilization and the use of commercially available (e.g., Amicon) concentration units. The following examples are offered by way of illustration, and not by way of limitation.

EXAMPLES

Example 1

Binding assay for detection and characterization of factor VIII:C binding peptides

Factor VIII:C binding is directly assayed using a factor VIII:C-enriched protein concentrate and radiolabeled monoclonal antibodies directed against factor VIII:C. A 96-well break-apart microtiter plate (Dynatech, Alexandria, Va.) is coated with native protein or peptide. A factor VIII:C-enriched protein concentrate is added to the plate and incubated for one hour. Excess factor VIII:C is removed from the plates after incubation. Radiolabeled monoclonal antibodies, specifically directed against factor VIII:C, are added to the plate and allowed to incubate for one hour. After incubation, excess label is removed and bound antibody is measured.

Alternatively, direct binding may be assayed using the binding peptide-coated plates. Radiolabeled factor VIII:C may be used as a direct measure of factor VIII:C binding to the binding peptide. Radiolabeled vWF may be readily substituted in this assay to identify binding peptides specific for vWF.

Example 2

Identification of the GPIb binding domain for vWF

As noted above, the binding domain for vWF resides in the α -chain of GPIb. The cDNA encoding the α -chain of GPIb has been cloned and sequenced and is shown in the Figure. The binding region is determined by synthesis of 20-amino-acid-long, overlapping peptides covering the first 340 amino acids of the mature α chain of GPIb.

The vWF-factor VIII binding region of GPIb was identified by screening 22 synthetic peptides derived from the amino-terminal half of the GPIb molecule for the ability to bind to the vWF-factor VIII complex. The synthetic peptides (obtained from Biosearch, Inc., San Rafael, Calif.) were designed as 20-residue fragments with a 5-residue overlap between pairs. Affinity gels, prepared by linking the amino groups of the synthetic peptides to amino hexanoic acid activated Sepharose-4B (CH-activated-Sepharose 4B, obtained from Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.) were used to screen the peptides for binding. Briefly, the experimental procedure included mixing reconstituted factor VIII concentrate (Alpha Therapeutic Corporation, Los Angeles, Calif.) with the gel bound peptides, washing the resulting complex and eluting the factor VIII activity. The ability of the immobilized GPIb-derived peptides to bind to factor VIII was evaluated by determining the factor VIII activity in the starting material, column wash, and the column elute.

The peptides (5-10 mg) were dissolved in DMSO (2-3 mls), mixed with an equal volume of coupling buffer (0.1 M NaHCO₃, pH 8.0) and then added to 3-5 mls of swollen, prewashed CH-activated-Sepharose 4B (the gel was processed as suggested by the manufacturer). The mixture was incubated on a rocker at 4°C for 20 hours. The coupling reaction was continued for one hour at 22°C. The gels were then poured into columns and washed with coupling buffer followed by DMSO. The initial wash (coupling supernate) was

saved for analysis. The gels were blocked with 0.2 M glycine, pH 8.5 and presaturated with 1% BSA in 20 mM imidazole buffer, pH 6.8, containing 150 mM NaCl (IBS) for 1 hour at 22 °C. The peptide-coupled, glycine-blocked, BSA-treated columns were washed extensively with IBS and used in binding experiments as described below. Control columns were prepared by using the same procedure except that the peptide
 5 was omitted from the protocol. The extent of coupling was calculated after estimating the amount of peptide in the starting material, coupling supernate and initial washes using the ninhydrin reagent. Using this procedure, 40% to 60% of each peptide was found to be coupled to the affinity chromatography gel.

Factor VIII concentrate, reconstituted in IBS, was mixed with GPIb-peptide-Sepharose and incubated at 22 °C for 2 hours on a rocker. At the end of the incubation period the gel suspension was poured into a
 10 column, allowed to settle, and washed with IBS until the absorbance of the effluent as monitored at 280 nm reached the baseline. Factor VIII bound to the column was eluted with IBS containing 0.5 M NaCl and 0.2% Tween-80. The flow rate of the solvents during wash and elution was maintained at 0.7 ml per minute.

The factor VIII activity in the starting material, column effluent and eluate was quantitated by the one-stage clotting assay in order to evaluate the performance of the column. Pooled normal human plasma was used as the standard in the clotting assays. Mega-1 factor VIII standard (obtained from Alpha Therapeutic
 15 Corporation, Los Angeles, Calif.) was used to calibrate the pooled normal plasma. Factor VIII deficient plasma and pooled normal plasma were obtained from George King Biomedical, Inc., Overland Park, Kans. Clotting assays were done using an MLA-Electra-800 automatic coagulation timer (Medical Laboratory Automation, Inc., New York).

Data from the binding experiments identified four peptides which were capable of binding to the factor
 20 VIII in the reconstituted concentrate. These peptides correspond to amino acid segments 165-184, 180-199, 195-214 and 240-259 of GPIb. Primary sequences of these four peptides are shown in Table 1.

Table 1

Amino Acid Sequences of Factor VIII Binding Peptides of GPIb		
Region	Sequence	Designation
165-184	AGLLNGLENLDTLLQLQENSL	Pep-12
180-199	QENSLYTIPKGFSGSHLLPF	Pep-13
195-214	HLLPFAFLHGNPWLCNCEIL	Pep-14
240-259	TSNVASVQCNDSDKFPVYKY	Pep-17

Data from the binding experiments are presented in Table 2.

Table 2

Sample	Factor VIII (units)				
	Pep-12	Pep-13	Pep-14	Pep-17	CH-Sep
Set A Starting Material	62	62	62	62	62
Effluent	42.4 (69)	11.6 (19)	22 (36)	20.2 (33)	60.8 (98)
Eluate	7.8 (13)	14 (23)	16.8 (27)	21.6 (35)	1.6 (2.6)
	Pep-12	Pep-13	Pep-14	Pep-17	CH-Sep
Set B Starting Material	27.4	27.4	27.4	27.4	27.4
Effluent	24 (88)	6.2 (22.6)	12.2 (44.5)	8.0 (29.2)	28 (102)
Eluate	3.2 (11.7)	5.0 (18.3)	11.2 (40.9)	7.4 (27)	NA

In set B the gels were precleaned with water and 50% CH₃CN followed by IBS pH 6.8 prior to the experiment. NA: Elution of factor VIII was not attempted.

The numbers in parentheses represent percent factor VIII in those fractions.

The data presented in Table 2 indicate that the vWF-factor VIII binding region of GPIb is situated between amino acid residues 165 and 260 of the protein. The data also support the concepts that the binding site is

made up of amino acids from a linear stretch of residues in the GPIb molecule and peptides derived from this region can be used for affinity purification of factor VIII or vWF-factor VIII complexes. Based on these results, it is predicted that peptides derived from amino acid residues 215 to 239 of GPIb are involved in the binding of the vWF-factor VIII complex. The sequences of two overlapping peptides representing this region (designated Pep-15 and Pep-16) are shown in Table 3.

Table 3

Region	Sequence	Designation
210-229	NCEILYFRRWLQDNAENVYV	Pep-15
225-244	ENVYVWKQGV D VKAMTSNVA	Pep-16

Example 3Identification of the binding domain for factor VIII:C on vWF

The binding domain for factor VIII:C on vWF is determined using limited proteolytic and chemical cleavage of vWF. vWF is purified by the method described by Chopek et al. (Biochem. 25:3146-3155, 1986). The purified vWF is subjected to degradation using CNBr cleavage (E. Gross and B. Witkop, J. Biol. Chem. 237:1856-1860, 1962) to generate vWF peptides. Alternatively, peptides are generated by using, for example, trypsin, chymotrypsin, lysine endopeptidase, or Staphylococcus aureus V-8 protease (Chopek et al., *ibid.*).

The peptide mixture from the chemical or enzymatic digestion of vWF is subjected to chromatography on an HPLC/gel-permeation column (GF-250, Dupont). Following this initial purification, the individual peaks from the gel-permeation column are subjected to further purification on HPLC columns using water-acetonitrile or water-n-propanol gradients containing 0.1% trifluoroacetic acid.

Alternatively, overlapping peptides may be synthesized on the basis of the amino acid sequence for von Willebrand factor (Titani et al., Biochemistry 25:3171-3184, 1986).

The purified peptides are used in binding assays as described in Example 1 and Example 2.

Example 4<<Identification of binding domains for factor VIII:C on factor X and IX

Factors X and IXa are purified by the method described by Modi et al. (Thromb. Res. 36:537-547, 1984). Purified peptides derived from these purified factors, native as well as reduced alkylated forms, are generated using the chemical and enzymatic procedures described in Examples 2 and 3.

The peptides are screened using binding assays as described in Example 1 and Example 2.

Example 5

Affinity purification using a binding peptide specific for vWF

An affinity matrix (e.g., prepared as described in Example 2) is incubated with a sample containing factor VIII:C. This mixture is incubated overnight at 4 ° C. The affinity matrix with bound factor VIII:C or vWF-factor VIII:C complex is then packed into a column and washed with appropriate buffers (i.e., 20 mM imidazole-HCl, pH 6.8, 10 mM CaCl₂ or 10% glycerol). Elution of specifically bound factor VIII:C is accomplished by washing this column with a calcium or sodium ion gradient. The bound factor VIII:C elutes at approximately 0.3 M CaCl₂. Bound factor VIII:C-vWF complex is eluted from the column with a pH gradient. If desired, the eluted complex may be dissociated by CaCl₂ treatment and the factor VIII:C and/or vWF recovered by size fractionation (e.g., gel filtration).

Example 6Affinity purification using a vWF-derived peptide

A factor VIII:C-binding peptide is derived from von Willebrand factor as described in Example 3. The peptide, preferably containing a terminal lysine or cysteine residue, is coupled to a solid matrix as described in Example 2.

A sample of factor VIII:C-vWF complex is adjusted to 0.3 M to 0.5 M CaCl₂. The sample is then mixed with the prepared affinity matrix and the CaCl₂ concentration of the mixture is reduced to permit binding of the factor VIII:C to the matrix. The mixture is then packed into a column and washed with a suitable buffer. The bound factor VIII:C is eluted from the washed column with 0.3 M to 0.5 M CaCl₂.

From the foregoing it will be appreciated that, although specific embodiments of the invention have been described herein for purposes of illustration, various modifications may be made without deviating from the spirit and scope of the invention. Accordingly, the invention is not limited except as by the appended claims.

The features disclosed in the foregoing description, in the claims and/or in the accompanying drawings may, both separately and in any combination thereof, be material for realising the invention in diverse forms thereof.

Claims

1. A peptide that specifically binds to von Willebrand factor, comprising at least a portion of the amino terminal 340 amino acids of glycoprotein Ib.
2. The peptide of claim 1 wherein said peptide consists of between approximately four amino acids and forty amino acids.
3. The peptide of claim 1 wherein said peptide includes a terminal lysine or cysteine residue.
4. The peptide of claim 1 wherein said peptide consists of between approximately four and forty amino acids and comprises a sequence corresponding to a portion of amino acids 165-260 of glycoprotein Ib.
5. The peptide of claim 1 wherein said peptide is selected from the group consisting of PEP-12, PEP-13, PEP-14, PEP-15, PEP-16 and PEP-17.
6. A peptide that specifically binds to factor VIII:C, comprising at least a portion of von Willebrand factor from four to forty amino acids in length.
7. A peptide that specifically binds to factor VIII:C, comprising at least a portion of factor IX from four to forty amino acids in length.
8. A peptide that specifically binds to factor VIII:C, comprising at least a portion of factor X from four to forty amino acids in length.
9. The peptide of claim 6-8 wherein said peptide includes a terminal lysine or cysteine residue.
10. A method for purifying von Willebrand factor (vWF) or a factor VIII:C-von Willebrand factor complex from a heterogeneous biological fluid, comprising:
 - exposing the biological fluid to a peptide according to any of claims 1-6, said peptide bound to an

insoluble matrix such that the vWF or factor VIII:C-vWF complex specifically binds to said peptide;
eluting the bound vWF or factor VIII:C-vWF complex from the peptide; and
collecting the vWF- or factor VIII:C-vWF complex-containing eluate.

11. The method of claim 10 including, subsequent to the step of exposing, washing non-specifically
5 bound elements from the matrix.

12. The method of claim 10 including, subsequent to the step of collecting, concentrating the factor
VIII:C-vWF complex or the vWF.

13. The method of claim 10 wherein the step of eluting comprises exposing the bound vWF or factor
VIII:C-vWF complex to a pH gradient or a high salt buffer.

10 14. A method for purifying factor VIII:C from a heterogenous biological fluid containing factor VIII:C-vWF
complexes, comprising:

exposing the biological fluid to a peptide according to any of claims 1-9, said peptide bound to an
insoluble matrix, such that the factor VIII:C-vWF complex specifically binds to said peptide;

eluting the factor VIII:C from the complex; and

15 collecting the factor VIII:C-containing eluate.

15. The method of claim 14 wherein the step of eluting comprises exposing the bound complex to a
high ionic strength solution.

16. A method for purifying factor VIII:C from a complex of factor VIII:C and vWF, comprising:

dissociating the factor VIII:C-vWF complex;

20 exposing the dissociated complex to a peptide that specifically binds to factor VIII:C, said peptide
bound to an insoluble matrix, such that factor VIII:C specifically binds to said peptide;

eluting the bound factor VIII:C from the peptide; and

collecting the factor VIII:C-containing eluate.

17. A method for purifying factor VIII:C from a heterogeneous biological fluid containing factor VIII:C-
25 vWF complexes, comprising:

exposing the biological fluid to a peptide that specifically binds to either factor VIII:C or vWF, said
peptide being bound to an insoluble matrix, such that factor VIII:C-vWF complex specifically binds to the
peptide;

eluting the bound complex from the peptide;

30 dissociating the factor VIII:C-vWF complex; and

isolating the factor VIII:C.

18. The peptide according to any of claims 1-9, for use as an active therapeutic substance.

91.

FIGURE

K S T T E P T P S P T T S E P V P E P A P H T T L E P T P 390
 AAA TCC ACT ACT GAA CCA ACC CCA AGC CCG ACC TCA GAG CCC CCG GAG CCC GCC CCA AAC ATG ACC ACC CTG GAG CCC ACT CCA 1260
 S P T T P E P T S E P A P S P T T P E P T P I P T I A T S P 420
 AGC CCG ACC CCA GAG CCC ACC TCA GAG CCC ACC CCG ACC CCG GAG CCC ACC CCA ATG ACC ATG GCC ACA AGC CCG 1350
 T I L V S A T S L I T P K S T F L T T T TCA CTC TCA CTC TTA GAA TCC ACC AAA 450
 ACC ATC CTG GTG TCT GCC ACA AGC CTG ATC CCA AAA AGC ACA TTT TTA ACT ACC ACA AAA CCC GTA TCA CTC TTA GAA TCC ACC AAA 1440
 K T I P E L D Q P P K L R G V L Q G H L E S S R N D P F L H 480
 AAA ACC ATC CCT GAA CTT GAT CAG CCA CCA AAG CTC CGT GGG GTG CTC CAA GGG CAT TTG GAG AGC TCC AGA AAT GAC CCT TTT CTC CAC 1530
 P D F C C L L P L G F Y V L G L F W L L F A S V V L I L L L 510
 CCC GAC TTT TCG TCG CTC CTC GGC TTC TAT GTC TTG GGT CTC TTC TGG CTC CTC TTT GCC TCT GTG GTC CTC ATC CTC CTC CTC 1620
 S H V G H V K P Q A L D S G Q G A A L T T A T Q T T H L E L 540
 AGC TGG GTT GGG CAT GTG AAA CCA CAG GCC CTC GAC TCT GGC CAA GGT GCT CTC ACC ACA GCC ACA CAA ACC ACA CAC CTC GAG CTC 1710
 Q R G R Q V T V P R A W L L F L R G S L P T F R S S L F L H 570
 CAG AGG GGA CCG CAA GTG ACA GTG CCC CCG GGC TGG CTC CTC TTC CTT CGA GGT TCG CTT TCC ACT TTC CCG TCC AGC CTC TTC CTC TCG 1800
 V R P N G R V G P L V A G R R P S A L S Q G R G Q D L L S T 600
 GTA CCG CCT AAT GGC CGT GTG GGG CCA CTA GTG GCA GGA AGG AGG CCC TCA GGT CTG AGT CAG GGT CGT CAG GAC CTC CTC AGC ACA 1890
 V S I R Y S G H S L stop 610
 GTG AGC ATT AGG TAC TCT GGC CAC AGC CTC TGA GGG TGG GAG GTT TGG GGA CCT TGA GAG AAG AGC CTC TGG GCT CTC CTA TTG GAA TCT 1980
 AGT TGG GGG TTG GAG GGA TAA GGA ACA CAG GGT GAT AGG GGA GGG GTT TTA GTT CCT TTT TCT GTA TCA GAA GCC CTC TCT TCA CAA CAC 2070
 AGG CAC ACA ATT TCA GTC CCA GCC AAA GCA GAA GGG GTA ATG ACA TGG ACT TCG CCG GGG GAC AAG ACA AAG CTC CCG ATG CTC CAT GGG 2160
 GCG CTG CCA GAT CTC ACG GTG AAC CAT TTT GGC AGA ATA CAG CAT GGT TCC CAC ATG CAT CTA TGC ACA GAA GAA AAT CTC GAA AGT GAT 2250
 TTA TCA GGA TGT GAG CAC TCG TTG TGT CTG GAT GTT ACA AAT ATG GGT GGT TTT ATT TTC TTT TTC CCT GTT TAG CAT TTT CTA GTT TTC 2340
 CAC TAT TAT TGT ATA TTA TCT GTA TAA TAA AAA ATA ATT TTA GGG TTG GGA AAA AAA AAA AAA AAG AAA AAA AAA AA 2420

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Publication number:

**0 295 645
A3**

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application number: **88109532.7**

(51) Int. Cl.⁵: **C07K 7/08, C07K 3/18,
A61K 37/02**

(22) Date of filing: **15.06.88**

(30) Priority: **16.06.87 US 62896
02.03.88 US 162877**

(43) Date of publication of application:
21.12.88 Bulletin 88/51

(84) Designated Contracting States:
DE ES GB IT NL SE

(98) Date of deferred publication of the search report:
10.10.90 Bulletin 90/41

(71) Applicant: **ZYMOGENETICS INC.
4225 Roosevelt Way, N.E.
Seattle Washington 98105(US)**

(72) Inventor: **Kumar, Anur Ashok
4509 Fremont Avenue North Nr. 4
Seattle Washington 98103(US)**
Inventor: **Hagen, Frederick S.
3835 - 44th Avenue N.E.
Seattle Washington 98105(US)**
Inventor: **Sledziewski, Andrzej Z.
14543 - 30th Avenue N.E.
Seattle Washington 98155(US)**

(74) Representative: **Brown, John David et al
FORRESTER & BOEHMERT
Widenmayerstrasse 4/I
D-8000 München 22(DE)**

(54) **Method for purifying factor VIII:C, Von Willebrand factor and complexes thereof.**

(57) Methods for purifying factor VIII:C, von Willebrand factor (vWF) or complexes thereof from heterogeneous biological fluids are disclosed. The methods utilize a binding peptide, specific to either factor VIII:C or vWF, bound to an insoluble matrix. Peptides suitable for use within the methods are also disclosed.

EP 0 295 645 A3



European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application number
EP 88 10 9532

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl. 4)
X	THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 261, no. 27, September 25, 1986, pages 12579-12585, The American Society of Biological Chemists, Inc., US; M. HANDA et al.: "The von Willebrand factor-binding domain of platelet membrane glycoprotein Ib. Characterization by monoclonal antibodies and partial amino acid sequence analysis of proteolytic fragments"		C 07 K 7/08 C 07 K 3/18 A 61 K 37/02
	* The whole article *	1	
	--		
P,X	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 84, August 1987, pages 5610-5614; K. TITANI et al.: "Amino acid sequence of the von Willebrand factor-binding domain of platelet membrane glycoprotein Ib"		
	* The whole article *	1	
	--		
A	WO-A-85 4585 (NEW ENGLAND DEACONESS HOSPITAL) -----		C 07 K A 61 K
The present invention is based on the following documents:			
Place of search The Hague		Date of completion of the search 27-03-1990	Examiner NOVOA Y SANJURJO
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published n. or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	



LACK OF UNITY OF INVENTION

The Search Division considers that the present European patent application does not comply with the requirement of unity of invention and relates to several inventions or groups of inventions, namely:

1. Claims 1-5 and 10-18(partially): Peptides that specifically bind to von Willebrand factor, comprising a portion of the amino terminal sequence of glycoprotein Ib and their use for purifying VWF, factor VIII:C and VWF-factor VIII:C complex.
2. Claims 6 and 9-18(partially): Peptides that specifically bind to factor VIII:C, comprising a portion of von Willebrand factor and their use for purifying VWF, factor VIII:C, and VWF-factor VIII:C complex.
3. Claims 7,9(partially),14-18(partially): Peptides that specifically bind to factor VIII:C, comprising a portion of factor IX and their use for purifying factor VIII:C.
4. Claims 8,9(partially),14-18(partially): Peptides that specifically bind to factor VIII:C, comprising a portion of factor X and their use for purifying factor VIII:C.

